

# **Untersuchungen zur CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit pflanzlicher Aquaporine im heterologen Hefesystem**

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Hochschule Darmstadt  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
eines Doctor rerum naturalium  
genehmigte  
Dissertation von

**Dipl. Biol. Nadine Pede**  
aus  
**Leverkusen**

Berichterstatter: Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Tag der Einreichung: 20.03.2008  
Tag der mündlichen Prüfung: 06.05.2008

Darmstadt 2008

D17

## Vielen Dank!

An **Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff** für die Ermöglichung der Doktorarbeit, sein Vertrauen, die Hilfe und Unterstützung.

An **Prof. Dr. Gerhard Thiel** für die Bereitschaft das Zweitgutachten dieser Arbeit zu Übernehmen.

Der gesamten **AG Kaldenhoff** (aktuellen und ehemaligen Mitgliedern) für die Unterstützung in jeder Hinsicht

**Matthias Fischer** für das Überlassen seiner gebastelten Aquaporin Konstrukte

**Dr. Xana Belastegui** und **Marlies Heckwolf** für die Hilfe bei der Lösung des 2 $\mu$ / Leu Problems und ihre Freundschaft.

**Kerstin Fileschi** und **Marc Bleischwitz** für das Mutmachen und die Freundschaft.

**Dr. Adam Bertl** für die Hilfestellung an der *Stopped Flow*, die Bereitstellung der Carboanhydrase und des TOK1, sowie die Diskussionsbereitschaft

**Florian Cymer** von der Uni Freiburg für die Bereitstellung des GlpF E43A.

**Prof. Dr. Gerolf Gros** von der medizinischen Hochschule Hannover (MHH) für die Möglichkeit meine Proben in seinem Institut massenspektrometrisch zu messen und die Diskussion.

**Dr. Volker Endeward** von der MHH für die Messung und Diskussion.

## Allen Korrekturlesern

Zum zweiten Mal:

**meinen Eltern**, für die Ermunterung zum Studium, die Chance meinen eigenen Weg zu gehen, die große Unterstützung und den Glauben an mich. Ich kann Euch nicht genug danken!

Meinem Bruder **Pierre** für die Lösung etlicher Computerprobleme.

meiner besten Freundin **Mareike** (die Liste würde die Seite sprengen!)

Und zu guter Letzt **Michael** für alles (die Liste hätte mindestens den Umfang dieser Arbeit)!

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>7</b>
2.1 Chemikalien .....	7
2.2 Verfahren mit <i>Escherichia coli</i> .....	7
2.2.1 Verwendete <i>Escherichia coli</i> Stämme.....	7
2.2.2 Herstellung einer Dauerkultur von <i>E. coli</i> .....	7
2.2.3 Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> .....	8
2.2.4 Transformation kompetenter <i>E.coli</i> zur Überprüfung der Kompetenz .....	8
2.2.5 Hitzeschocktransformation von <i>E. coli</i> .....	9
2.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	10
2.3 Arbeiten mit DNA.....	11
2.3.1 Photometrisches Vermessen der DNA.....	11
2.3.2 Restriktionsabbau von Plasmiden.....	11
2.3.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in einem Agarosegel .....	12
2.3.4 Elution von DNA aus einem Agarosegel.....	12
2.3.5 Die Polymerase Kettenreaktion .....	13
2.3.6 Klonierung der Konstrukte .....	14
2.4 Arbeiten mit Hefe .....	15
2.4.1 Der Hefestamm <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SY1.....	15
2.4.2 Anzucht des SY1-Hefestammes .....	16
2.4.3 Kultivierung der Hefe für die Messungen mit dem <i>Stopped Flow</i> Spektrophotometer.....	16
2.4.4 Transformation von SY1-Hefe mit der Hitzeschockmethode .....	18
2.4.5. Biolistische Transformation von SY1-Hefezellen .....	19
2.4.6 Klonierung mittels <i>in vivo</i> Rekombination von Hefe (Drag & Drop) .....	19
2.4.7 Isolation von Plasmid-DNA aus Hefezellen .....	20
2.4.8 Einfache Proteinisolation aus Hefe mittels säurebehandelten Glaskugeln.....	21
2.4.9 Isolation von Hefe-Plasmamembranen .....	22
2.5 Arbeiten mit Ribonukleinsäuren (RNA) .....	24
2.5.1 Isolation von RNA aus Hefezellen .....	24
2.5.2 Auftrennen von RNA mittels Gelelektrophorese.....	25
2.5.3. Transfer von Gesamt-RNA auf eine Membran (Northern-Hybridsierung) .....	26
2.5.4 Herstellung einer DIG-11-UTP markierten cDNA Sonde.....	27
2.5.5 Hybridisierung der Membran mit einer DIG-markierten Sonde.....	27

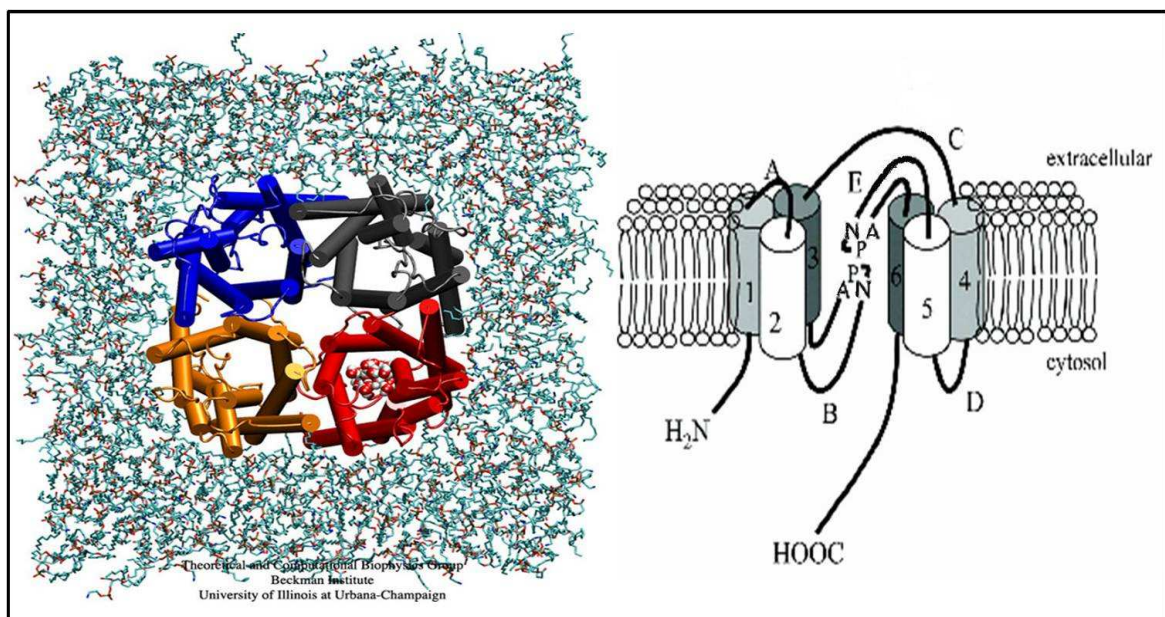
2.5.6 Nachweis mit einem Antikörper und Detektion .....	28
2.6 Arbeiten mit Proteinen .....	29
2.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	29
2.6.2 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	30
2.6.3 Western Blot Analyse von Proteinen .....	32
2.6.4 Nachweis des Transfers von Proteinen auf eine Nitrozellulose-Membran .....	33
2.6.5 Immunodetektion der Proteine durch Chemolumineszenz .....	33
2.7. Messung der CO <sub>2</sub> -Leitfähigkeit von Aquaporinen .....	35
2.7.1 Die Farbstoffe Carboxyfluorescein (CF) und Fluoresceinbisacetat (FBA) .....	35
2.7.2 Erstellung einer Fluoreszenz-Eichgerade für Fluoresceinbisacetat .....	37
2.7.3 Isolation sekretorischer Hefevesikel .....	38
2.7.4 Färben ganzer SY1-Hefezellen mit Fluoresceinbisacetat (FBA) .....	40
2.7.5 Das Prinzip der CO <sub>2</sub> -Messung .....	41
2.7.6 Das <i>Stopped Flow</i> Spektrophotometer .....	42
2.7.7 Die Einstellungen an der <i>Stopped Flow</i> Apparatur .....	43
2.8 Auswertung der Daten.....	44
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
3.1 Verwendung sekretorischer Hefevesikel .....	48
3.1.1 Größenbestimmung der sekretorischen Hefevesikel .....	48
3.1.2. Erste Messungen der CO <sub>2</sub> -Leitfähigkeit der sekretorischen Vesikel mittels Stopped Flow Spektrometrie .....	50
3.1.3 Optimierte Messung der CO <sub>2</sub> -Leitfähigkeit mit sekretorischen Hefe Vesikeln.....	51
3.2 Verwendung der Tabak-Carboanhydrase für das Hefesystem.....	52
3.2.1 Klonierung der Tabak-Carboanhydrase (CA) in pGREG 505 (Euroscarf) .....	53
3.2.2 Modifikation des pGREG505_CA Plasmids .....	56
3.2.3 Untersuchung der CO <sub>2</sub> -Leitfähigkeit des modifizierten pGREG505_2μ_CA .....	57
3.2.4 Ermittlung der optimalen Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> ) Konzentration im Mischpuffer.....	58
3.2.5 Analyse der Enzymaktivität der Tabak-Carboanhydrase mittels Massenspektrometer ....	60
3.3. Herstellung weiterer Aquaporin Konstrukte .....	61
3.3.1 Generierung eines 3Helix-Konstruktes von NtPIP2;1 und NtAQP1 .....	61
3.3.2 Analyse der beiden 3Helix-Konstrukte mittels Western Hybridisierung .....	62
3.3.3 Herstellung eines Homotetramers aus vier NtAQP1 Aquaporinen .....	63
3.3.4 Nachweis aller verwendeten Proteinkonstrukte in der Hefe-Plasmamembran.....	64

3.3.5 Bestimmung des finalen internen Zell-pH mit einem Fluoreszenzspektrometer.....	65
3.4 Analyse der CO <sub>2</sub> -Leitfähigkeit pflanzlicher Aquaporine mit ganzen Hefezellen.....	66
3.4.1 Analyse von n_NtPIP2;1_NtAQP1 (n_P2A1) .....	66
3.4.2 Analyse der CO <sub>2</sub> -Leitfähigkeit der Homo- und Heterotetramere von NtAQP1 und NtPIP 2;1 .....	67
3.4.3 Untersuchung eines weiteren Aquaporins und seiner Mutanten auf CO <sub>2</sub> -Leitfähigkeit....	69
3.4.4 Analyse des GlpF aus <i>E. coli</i> und eines Kaliumkanals (TOK1) aus <i>S. cerevisiae</i> auf CO <sub>2</sub> -Leitfähigkeit .....	71
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>73</b>
4.1. Analyse sekretorischen Hefevesikeln .....	73
4.2. Messungen mit ganzen Hefezellen.....	74
4.3 Untersuchung der 3Helix-Konstrukte .....	77
4.4 Analyse von n_NtPIP2,1_NtAQP1 (n_P2A1) .....	79
4.5 Analyse der Homo- und Heterotetramere von NtAQP1 und NtPIP2;1 .....	79
4.6 Analyse von TaTIP2;2 und seinen Mutanten .....	81
4.7 Analyse des bakteriellen GlpF.....	82
4.8 Untersuchung des Kaliumkanals TOK1 .....	83
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>84</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>85</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>92</b>
7.1 Sequenzen .....	92
7.2 Verwendete Homo- und Heterotetramere Konstrukte.....	94
7.3 Auflistung der im Ergebnisteil dargestellten P <sub>CO2</sub> -Werte.....	95
7.4 Abkürzungsverzeichnis .....	96
7.5 Ein-, bzw. Dreibuchstabencode der Aminosäuren .....	98
7.6 Veröffentlichung von Teilergebnissen.....	98

## 1. Einleitung

Wasser bildet die Basis aller physiologisch relevanten Lebensvorgänge. Es dient als Medium für gelöste Nährstoffe und Gase. Die frühere Sicht, dass Wassertransport ausschließlich mittels Diffusion über die Lipid-Doppelschicht biologischer Membranen erfolgt, änderte sich aufgrund zweier wichtiger Beobachtungen. Es wurde entdeckt, dass manche Membranen eine zu hohe Durchlässigkeit für Wasser aufwiesen, was nicht durch Diffusion allein erklärbar war (Paganelli und Solomon 1957). Daneben wurden Membranen beschrieben, die kaum eine Durchlässigkeit für Wasser besaßen (Prescott und Zeuthen 1953), was ebenfalls die Frage nach einem Transportsystem aufwarf. Mittlerweile wurden viele membranintrinsische Proteine entdeckt, die hier von Bedeutung sind. Aufgrund ihrer zuerst detektierten Leitfähigkeit für Wasser wurde die Familie dieser Proteine Aquaporine genannt. Bis heute sind diese bei Prokaryoten (Calamita, Kempf et al. 1998), Archaeen (Kozono, Ding et al. 2003), Protozoen (Mitra, Yoshino et al. 2000), Pilzen (Bonhivers, Carbrey et al. 1998), Insekten (Beuron, Le Caherec et al. 1995), Pflanzen (Maurel and Chrispeels 2001) und Tieren beschrieben. Kristallisationen des menschlichen Aquaporins HsAQP1, des bakteriellen Glycerinkanals GlpF aus *E.coli* und auch des pflanzlichen Aquaporins SoPIP2 aus Spinat (Fu, Libson et al. 2000; Sui, Han et al. 2001; Kukulski, Schenk et al. 2005) zeigten, dass Aquaporine eine tetramere Struktur besitzen, wobei jedes Monomer eine funktionelle Einheit bildet. Ein Monomer besteht aus sechs transmembranen Helices, die durch drei extra- und zwei intrazelluläre sogenannte *Loops* (Schleifen A-E) verbunden sind (Abbildung 1-I). Sowohl der N- als auch der C-Terminus des Proteins zeigen dabei in das Zytosol. Die extrazelluläre Halbhelix B und die interzelluläre Halbhelix E weisen ein konserviertes Aminosäuremuster auf, das nach dem Buchstabencode der vorkommenden Aminosäuren Asparagin (N), Prolin (P) und Alanin (A) auch NPA-Motiv genannt wird (Reizer, Reizer et al. 1993). Diese Region bildet die eigentliche Pore und verengt das Aquaporin (Hourglass-Model; (Jung,

Preston et al. 1994)). Eine zweite noch engere Stelle der Pore bildet der sogenannte aromatische/-Arginin Selektivitäts-Filter (ar/R). Dieser wird von vier Aminosäureresten, jeweils einer der Helices zwei und fünf sowie zwei Resten aus Schleife E, gebildet. Der Filter interagiert mit Wassermolekülen, die dieses sonst äußerst hydrophobe Porensegment überdecken und somit die Wasserleitung erleichtern (Fu, Libson et al. 2000; Sui, Han et al. 2001; Thomas, Bron et al. 2002). Durch neue Publikationen ist bekannt, dass Aquaporine neben Wasser auch für verschiedene andere Stoffe durchlässig sind. Unter anderem konnte Durchlässigkeit für Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ), Ammonium ( $\text{NH}_4$ ), Glycerin, Milchsäure u.a. nachgewiesen werden (Dean, Rivers et al. 1999; Froger, Rolland et al. 2001; Cooper, Zhou et al. 2002; Choi und Roberts 2007). Auch eine Leitfähigkeit für Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ) wurde bei tierischen Aquaporinen durch mehrere Gruppen beobachtet, wobei über eine physiologische Bedeutung diskutiert wird.



**Abbildung 1-I:** Aufsicht auf die Struktur eines Aquaporin Tetramers (links; entnommen von (Tajkhorshid, Nollert et al. 2002)) und schematischer Aufbau eines Aquaporin Monomers (rechts; modifiziert nach (Zardoya 2005)).

Bisher ist die gängige Sichtweise wie zuvor auch bei Wasser, dass der CO<sub>2</sub> Transport über biologische Membranen mittels Diffusion vonstatten geht (Gutknecht, Bisson et al. 1977). Da Membranen demnach eine hohe Leitfähigkeit für Gase zeigen, wurde Aquaporinen zunächst keine Rolle im CO<sub>2</sub>-Transport zugeschrieben. In den letzten Jahren hat sich diese Sichtweise jedoch geändert, da Weisbren *et al.* (Waisbren, Geibel et al. 1994) und Boron *et al.* (Boron, Waisbren et al. 1994) nachweisen konnten, dass Membranen des Magenepithels für Gase wie NH<sub>3</sub> und CO<sub>2</sub> nahezu impermeabel sind und es daher andere Routen für einen Transport geben muss. Damit rückten Aquaporine als mögliche Erklärung in den Vordergrund. Zumal z.B. das HsAQP1 in besonders hoher Zahl in Erythrozyten und dem Endothel der Lungenalveolen anzutreffen ist (Preston und Agre 1991; Verkman, Matthay et al. 2000), also an Orten, die in der tierischen Physiologie viel mit dem Austausch von CO<sub>2</sub> zu tun haben. Weitere Untersuchungen bezüglich der CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit von Aquaporinen brachten unterschiedliche Ergebnisse, wodurch die Diskussion um deren physiologische Rolle verstärkt wurde. So konnte für das HsAQP1 sowohl mit Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* (Cooper und Boron 1998; Nakhoul, Davis et al. 1998; Cooper, Zhou et al. 2002) als auch mit künstlichen Membranvesikeln, in denen das gereinigte Protein eingebettet war (Prasad, Coury et al. 1998), eine Leitfähigkeit für CO<sub>2</sub> nachgewiesen werden. Diesen Befunden wurde durch die Gruppe um Verkman (Yang, Fukuda et al. 2000; Fang, Yang et al. 2002) widersprochen, die bei Messungen an Erythrozyten und Lungen von wildtyp Mäusen und Mutanten (AQP null) keinerlei Unterschiede feststellten. Neben diesen physiologischen Nachweisen wurde in den letzten Jahren versucht durch Molekulardynamik-Simulationen Hinweise für oder gegen eine CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit zu bekommen. Sie sollten zeigen ob sich die Struktur des HsAQP1 überhaupt für CO<sub>2</sub>-Transport eignet. Hub und de Groot (Hub und de Groot 2006) simulierten eine CO<sub>2</sub>-Leitung durch HsAQP1, verglichen mit der durch eine künstliche Lipid-Doppelschicht. Ihre Schlussfolgerung war, dass der Energieaufwand für CO<sub>2</sub> um durch die Doppelschicht zu gelangen mit 4 kJ/mol sehr viel geringer ist, als durch die Pore des



Aquaporins (23 kJ/mol). Demnach würde sich ein solcher Aufwand für ein biologisches System nur lohnen, wenn die Membran selbst sehr impermeabel für Gase ist. So wurden Daten für und gegen eine CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit von Aquaporinen gefunden. Es stellt sich demnach die Frage, wie es sich für pflanzliche Aquaporine verhält. CO<sub>2</sub> hat für die Photosynthese der Pflanze eine tragende Rolle. Die Verfügbarkeit dieses Gases limitiert die Photosynthese und steuert die Schließzellbewegungen. Der genaue Mechanismus der Aufnahme von CO<sub>2</sub> in die unterschiedlichen Kompartimente ist dabei noch nicht bis ins letzte Detail geklärt. So könnten Aquaporine durchaus eine wichtige Rolle beim CO<sub>2</sub> Transport in Pflanzen spielen.

Für Pflanzen wie z.B. *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand), dessen Genom erfolgreich entschlüsselt wurde, konnten 35 Aquaporine nachgewiesen werden (Quigley, Rosenberg et al. 2002). Dies sind fast dreimal so viele wie beim Menschen (AQP0-12; (Magni, Sarto et al. 2006)). Auch ist die Diversität bei Pflanzen höher. Werden die Aquaporine beim Menschen nur in Wasser- und Glycerinleitende unterteilt, gliedern sie sich im Pflanzenreich nach ihrer Phylogenie in vier Gruppen. So spricht man von *Plasmamembran intrinsischen Proteinen* (PIPs), die nach ihrer Struktur und Leitfähigkeit nochmals in PIP1 und PIP2 Aquaporine unterteilt werden (Kammerloher, Fischer et al. 1994). Die PIP2 Aquaporine zeichnen sich dabei durch einen kürzeren N-Terminus und eine hohe Wasserleitfähigkeit aus. Daneben gibt es noch die *Tonoplast Intrinsischen Proteine* (TIPs), *Nodulin 26 ähnliche intrinsische Proteine* (NIPs) und die zuletzt entdeckten kleinen basischen intrinsischen Proteine (SIP; *small intrinsic proteins*) (Johanson und Gustavsson 2002). Ursprünglich erfolgte die Benennung der PIP und TIP Aquaporine nach ihrem Vorkommen in den Geweben. Mittlerweile sind aber Vertreter dieser beiden Familien auch in allen anderen intrazellulären Membranen nachgewiesen. Die NIP-Familie zeichnet sich durch hohe Sequenzhomologien zum Nodulin 26 in der Peribakteroidmembran nodulierter Sojabohnen-Wurzeln aus. Aber auch in Pflanzen, die keine Symbiose mit Bakterien bilden wurden sie in Plasmamembranen wie auch in intrazellulären Membranen

nachgewiesen. Die SIPs wurden bei Genomsequenzanalysen entdeckt. Sie kommen am häufigsten im Endoplasmatischen Retikulum der Pflanzen vor (Ishikawa, Suga et al. 2005). Über ihre Leitfähigkeiten und damit ihre Funktion ist jedoch noch wenig bekannt. Bei anderen Gruppen sind dagegen schon vielfältige Leitfähigkeiten bekannt. Für TIP und NIP Aquaporine konnte neben Wasser auch Durchlässigkeit für Ammonium, Glycerin und Harnstoff nachgewiesen werden (Biela, Grote et al. 1999; Dean, Rivers et al. 1999; Gerbeau, Guclu et al. 1999; Liu, Ludewig et al. 2003; Kojima, Bohner et al. 2006). Über den Transport der wichtigen Gase Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) und Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ) in Pflanzen gibt es einige Hinweise, jedoch ist der Mechanismus noch nicht vollständig geklärt. Für die Erforschung der  $\text{NH}_3$ -Leitfähigkeit wurden bisher zumeist Komplementierungsversuche mit Hefe und *Xenopus* Oozyten verwendet. Vor kurzem wurden Analysen mit einem *Stopped Flow* Spektrophotometer durchgeführt (Bertl und Kaldenhoff 2007), dessen Ergebnisse auch die Frage nach einem anderen Weg für die Gase durch die Tetramere aufwarf. So konnte die Wasserleitfähigkeit des Weizen-TIP mittels Quecksilber gehemmt werden, die Leitfähigkeit für  $\text{NH}_3$  jedoch nicht. Hieraus ergibt sich die Frage, ob der Gastransport durch die gleiche Pore vonstatten geht, wie bei Wasser. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die sogenannte fünfte Pore, die sich in der Mitte des Tetramers befindet, die eigentliche Gaspore sein könnte. Somit gibt es einige Erkenntnisse den molekularen  $\text{NH}_3$ -Transport betreffend, jedoch fehlen bisher entsprechende Experimente für  $\text{CO}_2$  in Pflanzen fast völlig. Die meisten Ergebnisse von Untersuchungen über  $\text{CO}_2$ -Leitfähigkeit wurden bisher über die Physiologie mittels Gaswechsellmessungen oder über die Photosyntheserate erzielt. Einzig Uehlein *et al.* (Uehlein, Lovisolo et al. 2003) zeigten für das dem HsAQP1 in der Porenregion nahezu identische NtAQP1 aus Tabak (*Nicotiana tabacum*) bei Untersuchungen in *Xenopus* Oozyten eine  $\text{CO}_2$ -Leitfähigkeit. Dies ist ein deutliches Indiz für  $\text{CO}_2$ -Leitfähigkeit pflanzlicher Aquaporine und sollte in der vorliegenden Arbeit weiter verfolgt werden.

## Ziele der Arbeit

Für die Messung der Leitfähigkeit pflanzlicher Aquaporine haben sich vor allem zwei Systeme hervorgetan. Neben dem *Xenopus* Oozyten System, mit dem wie angeführt auch schon CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit pflanzlicher Aquaporine nachgewiesen werden konnte, gibt es auch zahlreiche Untersuchungen mit der *Stopped Flow* Spektrophotometrie. Diese ist besonders für Messungen der Wasserleitfähigkeit schon gut etabliert. (Suga und Maeshima 2004; Soveral, Madeira et al. 2007). Dabei besitzt das *Stopped Flow* System Vorteile gegenüber dem Oozyten System. Dies liegt in der Verwendung von Hefezellen, die leicht transformiert und kultiviert werden können. Gegenüber Pflanzen und Fröschen haben sie eine viel schnellere Generationsphase. Der größte Vorteil dürfte aber in der Verwendung eines Hefeklons liegen, der genetisch identische Nachkommen hervorbringt. So können eventuelle Individuen-spezifische Schwankungen in den Messungen vermieden werden. Auch können im Gegensatz zum Oozyten-System tausende Hefezellen bei einer einzelnen Analyse verwendet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich ein System von heterolog exprimierenden Hefezellen für die Messung der Kohlendioxid-Leitfähigkeit pflanzlicher Aquaporine mittels *Stopped Flow* Spektrophotometrie eignet. Dazu wurden die schon gut charakterisierten Aquaporine NtAQP1 und NtPIP2;1 aus Tabak (*Nicotiana tabacum*) verwendet.

Daneben sollte die Interaktion zwischen dem CO<sub>2</sub> permeablen NtAQP1 und dem hoch wasserleitenden NtPIP2;1 im Hinblick auf Auswirkungen auf die Leitfähigkeit von CO<sub>2</sub> analysiert werden. Dazu wurden die in der Arbeit von Matthias Fischer konstruierten Heterotetramere verwendet.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben stammten die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien von der Firma Applichem (Darmstadt).

### 2.2 Verfahren mit *Escherichia coli*

#### 2.2.1 Verwendete *Escherichia coli* Stämme

In dieser Arbeit wurden folgende *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme verwendet:

<b>XL1blue</b>	Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI q $\Delta$ M15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]
<b>DH5<math>\alpha</math></b>	Genotyp: F <sup>-</sup> deoR recA1 endA1 hsdR1(r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) supE44 1-thi gyrA96 relA1

#### 2.2.2 Herstellung einer Dauerkultur von *E. coli*

Die *E. coli* Bakterien wurden aus einer Dauerkultur in 3ml LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und bei 37°C und 225 rpm über Nacht inkubiert. Für eine Dauerkultur wurde die Zellsuspension mit Glycerin einer Endkonzentration von 25% versetzt und bei -80°C gelagert.

<b>LB-Medium nach Luria-Bertani:</b>	10,0 g NaCl
	5,0 g Hefe-Extrakt
	10,0 g Trypton
	Ad 1 l bidest. Wasser, pH 7,5

### **2.2.3 Herstellung kompetenter *E.coli***

Für die Herstellung kompetenter *E.coli* wurden 50 ml LB Medium mit 1 ml einer frischen Über-Nacht Kultur angeimpft und bei 37°C und 225 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden dann in SS34 Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min auf Eis gekühlt. Danach erfolgte eine 10 min. Zentrifugation bei 4000 rpm und 4°C (SS-34 Rotor in einer Sorvall-Zentrifuge *RC5C Sorvall Instruments Du Pont*) Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml einer eiskalten 1M CaCl<sub>2</sub> Lösung durch vorsichtiges schütteln resuspendiert. Danach wurde erneut zentrifugiert und das Pellet in 2 ml einer eiskalten 0,1M CaCl<sub>2</sub> Lösung abermals resuspendiert. Zu der Zellsuspension wurde dann 1 ml einer Glycerinlösung (90% Glycerin, 0,1M CaCl<sub>2</sub>) hinzugegeben, 200 µl Aliquots in Eppendorfgefäße pipettiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Sie konnten dann bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert werden.

### **2.2.4 Transformation kompetenter *E.coli* zur Überprüfung der Kompetenz**

Um die Transformationseffizienz der kompetenten Zellen zu überprüfen wurde eine Transformation mit dem Vektor pBluescript SK durchgeführt. Dabei wurden 2 ng Plasmid (2 ng/µl) pro 200 µl kompetenter Bakterien eingesetzt und nach der Hitzeschockbehandlung (45 Sekunden 42°C) und 2 min Abkühlung auf Eis in 300 µl SOC Medium inkubiert. 1/10 des Ausgangsvolumens wurden auf Selektionsplatten ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien ausgezählt und die Kompetenz in Anzahl der Kolonien pro µg Plasmid berechnet.

### 2.2.5 Hitzeschocktransformation von *E. coli*

Die kompetenten *E. coli* Zellen wurden für die Transformation auf Eis aufgetaut. Zu 200 µl Bakterien wurden dann 50-100 ng Plasmid eines Ligationsansatzes oder Plasmids hinzugegeben, vorsichtig gemischt und für 30 min. auf Eis belassen. Nach einer Hitzeschockbehandlung (45 sec. 42°C im Wasserbad) wurden die Zellen für 2 min. auf Eis abgekühlt. Es folgte die Zugabe von 300 µl SOC Medium und eine Inkubation für 1 h. bei 37°C und 225 rpm. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agar Platten, die Ampicillin (50 µg/ml) oder ein anderes Antibiotikum zur Selektion enthielten, ausplattiert. Für eine Blau-Weiß Selektion nach einer TA-Klonierung wurde den Platten zusätzlich noch IPTG (60 µg/ml) und X-Gal (40 µg/ml) zugesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht im 37°C Brutschrank. Die gewachsenen resistenten oder Blau/Weiß selektierten Bakterien wurden dann mit sterilen Zahnstochern gepickt und zum Animpfen einer Über-Nachtkultur verwendet. Nach Isolation der Plasmide konnte die Transformation dann mittels Restriktionsanalyse und Gelelektrophoretischer Auftrennung überprüft werden.

<b>SOC-Medium:</b>	2 % Trypton	
	0,5 % Hefeextrakt	
	10 mM NaCl	
	2,5 mM KCl	
	10 mM MgCl <sub>2</sub>	
	10 mM MgSO <sub>4</sub>	
	20 mM Glukose	
		pH 7,0
<b>LB-Nähragar:</b>	1 % NaCl	
	1 % Trypton	
	0,5 % Hefeextrakt	(pH 7,5)
	1,5 % Agar (Roth)	

### 2.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Von einer Bakterienkultur, die über Nacht in LB-Nährmedium bei 225 rpm und 37°C gewachsen war, wurden 1,5 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 14.000 rpm für 30 sec bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Bakterien-Pellet in 300 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Puffer P2 wurde der Ansatz invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dies diente der Lyse der Zellen. Durch Hinzufügen von 300 µl Puffer P3 und 10 min Inkubation auf Eis wurden genomische DNA und Proteine gefällt. Anschließend wurden erneut bei 14.000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand mit der Plasmid-DNA wurde in ein neues Reaktionsröhrchen überführt und ein gleiches Volumen an Isopropanol hinzugegeben. Durch Zentrifugation für 15 min bei 14000 rpm wurden die Plasmide präzipitiert. Um störende Salze zu entfernen, wurde das Präzipitat mit kalten, 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde dann in 30 µl *Aqua dest.* resuspendiert und zur Verflüchtigung des restlichen Ethanols für 5 min. bei 37°C mit offenem Deckel inkubiert. Die DNA wurde dann bei -20°C aufbewahrt.

<b>Puffer P1 (Resuspensionspuffer):</b>	50 mM Tris-HCl pH8 10 mM EDTA 100 µg/ml RNaseA (Zugabe nach dem autoklavieren)
<b>Puffer P2 (Lysepuffer):</b>	200 mM NaOH, 1 % SDS
<b>Puffer P3(Neutralisationspuffer):</b>	3 M Kaliumacetat pH 5.5

## 2.3 Arbeiten mit DNA

### 2.3.1 Photometrisches Vermessen der DNA

Nach der Isolation aus *E. coli* wurden die Konzentration und die Reinheit der Plasmide mittels photometrischer Messung bestimmt. Dazu wurde in einem 100 µl Ansatz die DNA mit *Aqua dest.* 1 zu 50 verdünnt und in einem Photometer (S2 100 *Diode Array Spectrophotometer*, WPA Biowave) gegen *Aqua dest.* als Referenz vermessen. Dabei richtete sich das Augenmerk neben dem Wert für 260 nm (Absorptionsspektrum der Nukleinsäuren) auch auf die Quotienten von 260 nm/280 nm (Proteinspektrum) und 260nm/230 nm (Zuckerabsorbtion). Im Idealfall sollten diese weit unter dem Wert für OD<sub>260</sub> liegen. Bei einem Verhältnis  $A_{260/280}$  und  $A_{260/230}$  von 1,8 bis 2 ist die Verunreinigung der Probe durch Proteine und Polysaccharide gering.

### 2.3.2 Restriktionsabbau von Plasmiden

Zur Analyse wie auch zur weiteren Manipulation der DNA, z.B. zum Einbringen eines Fragmentes in einen anderen Vektor, wurden die Plasmide mit spezifischen Restriktionsenzymen geschnitten. Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend den Herstellervorgaben (MBI Fermentas, New England Biolabs) gewählt. Um einen vollständigen Abbau zu gewährleisten wurden pro µg DNA 2 Units (Einheiten) des Enzyms eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in den meisten Fällen für 1 h bei 37°C. Das Ergebnis wurde dann durch Auftrennung mittels Gelelektrophorese in einem Agarosegel überprüft.



### 2.3.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in einem Agarosegel

Die Trennung der DNA Fragmente nach ihrer Größe erfolgte in einem 1 % igen Agarosegel (Roth) mit 0,05 µg/ml Ethidiumbromid (Roth) und 1x TAE als Puffersystem. Die DNA Proben wurden mit 5x Orange Ladepuffer versetzt (Endkonzentration 1x) und auf das Gel aufgetragen. Als Standard zum Vergleich der Größen wurde ein Marker (200bp-10000bp; HYPERLADDER I<sup>TM</sup>, Bioline) mit aufgetrennt. Der Nachweis der DNA erfolgte durch die Fluoreszenz des DNA-interkalierenden Ethidiumbromids unter UV-Licht (ImageMaster, Pharmacia Biotech)

**50 x TAE-Puffer:**                    242 g Tris, pH 8,0  
                                             57,1 ml Essigsäure (99 %)  
                                             100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

**5 x DNA - Ladepuffer:**        2 % Ficoll 400  
                                             0,5 % SDS  
                                             50 mM EDTA  
                                             0,2 % Orange G  
                                             10 % Glycerin

### 2.3.4 Elution von DNA aus einem Agarosegel

Nach dem Auftrennen der DNA Fragmente in einem Agarosegel mit Ethidiumbromid konnten die Banden mit UV Licht (Transilluminator 302 nm) sichtbar gemacht und aus dem Gel herausgeschnitten werden. Der Agaroseblock wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nach dem Protokoll des Macherey & Nagel Gel Elution Kits weiterbearbeitet. Zur Überprüfung der Elution und zur Abschätzung der Menge mit Hilfe eines Markers (Hyperladder I; Bioline) wurde ein Aliquot dann erneut auf einem Agarosegel aufgetrennt.

### 2.3.5 Die Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Ketten Reaktion oder PCR (von *Polymerase chain reaction*) ist ein von Mullis *et al.* (Mullis and Faloona 1987) entdecktes Verfahren mit dem sich ein DNA-Fragment nahezu exponentiell und hoch spezifisch vervielfältigen lässt. In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR verwendet, um die ersten drei Transmembranen Helices von NtAQP1 und NtPIP2;1 von einer cDNA zu kopieren und sie über verschiedene Klonierungstechniken in andere Vektoren einzubringen. Die dabei verwendeten Primer sind in Tabelle 1 aufgeführt. Um sie abzuleiten wurde die ungefähre Lage der Helices mit dem SOSUI-Programm im Internet (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) festgestellt und auf die Nukleotidsequenz übertragen. Auch zur Analyse von erhaltenen oder vorliegenden Plasmiden wurde sie verwendet. Sämtliche verwendete Primer sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Als Standard diente dabei folgender Ansatz:

0,5 µl *Taq* DNA Polymerase (1 U/µl; Biotherm)  
0,5 µl dNTP Mix (10 mM)  
2,5 µl 10x PCR Puffer (enthält 15 mM MgCl<sub>2</sub>; Biotherm)  
0,5 µl sense Primer (10 pmol/ ml)  
0,5 µl antisense Primer (10 pmol/ ml)  
1 µl Template DNA

*Ad 25 µl Aqua dest (steril)*

Als Standard Programm wurde folgender Ablauf gewählt:

Initiale Denaturierung:	5 min 95 °C	
Denaturierungsschritt:	30 sec 95 °C	
Annealingschritt:	30 sec T <sub>m</sub> - 4 °C	25 Zyklen
Elongationsschritt:	1 min/1000 bp 72 °C	
finale Elongation:	5 min 72 °C	

Die Ansätze aus der PCR wurden dann zur Analyse auf ein 1% iges Agarosegel (siehe 2.3.3) aufgetragen.

**Tabelle 1:** Auflistung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer

Name	Nukleotidsequenz	Anwendung
Ca1_fw	5'GGATTCATGGAATTGCAATCATCAGATGA 3'	Verfielfältigung der Tabak-Carboanhydrase; Analyse
Ca1_rev	5'AAGCTTTCATACGGAAGAGAAGGAGAAAG 3'	"
Ca_pgreg_fw	5'GAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACAATGGAATTGCAATCATCAGATGG 3'	<i>In vivo</i> Rekombination per Drag & Drop
Ca_pgreg_rev	5'GCGTGACATAACTAATTACATGACTCGAGGTCGACTCATACGGAAGAGAAGGAGAAAG 3'	"
LEU2_fw	5'GGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCATGTCTGCCCTAAGAAGATCGTC 3'	Markeraustausch per <i>in vivo</i> Rekombination
LEU2_rev	5'GGAATTAATTCTCATCTTTGACAGCTTATCATCGATAAGTCCATTTTGAATTCGTGTCGTTT 3'	"
2μ_ORI_for	5'GATACGCCTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGCTTATCGATGATAAGCTGTCAAAG 3'	Einbringen des 2μ origin in pGREG505
2μ_ORI_rev	5'GAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAACCCATTGCGAATACCGCTTC 3'	"
NtPIP2_3helices_as	5' CCACCTAATGTGTTGTAGTAATGTT 3'	Konstruktion von NtPIP2,1_3Helix
NtAQP1_3heli_as	5'CATGAATCCCTTCACAACACCAGCAC 3'	Konstruktion von NtAQP1_3Helix
NtAQP1_Xbal_as	5'AAATCTAGATTAAGACGACTGTGGAATGGAATG 3'	Konstruktion von 4 x NtAQP1
NtAQP1_Xhol_fw	5'AAACTCGAGATGGCAGAAAACAAAGAAGAAG 3'	"

### 2.3.6 Klonierung der Konstrukte

Die Klonierung erfolgte über das sogenannte *TA*-Cloning (Quiagen) und Restriktionsendonukleasen. Das 3-Helix Genfragment von NtAQP1 und NtPIP2;1 wurde mittels PCR vervielfältigt und dann nach Herstellerangaben in den Vektor pDrive eingebracht. Nach Selektion und Anzucht in *E.coli* wurde eine Mini Präparation der Plasmide (siehe 2.2.5) vorgenommen. Aus den Plasmiden konnte dann das Fragment mit geeigneten Restriktionsenzymen aus pDrive ausgeschnitten und in die *multiple cloning site* des Vektors pYes2/CT (Invitrogen) mittels Ligation mit T4 Ligase (Fermentas) nach Firmenprotokoll einkloniert werden.

## 2.4 Arbeiten mit Hefe

### 2.4.1 Der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* SY1

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden mit dem Hefestamm SY1 (MATa, *ura3-52*, *leu2-3, 112*, *his4-619*, *sec6-4*, *GAL*). durchgeführt. Dieser entstand aus der Kreuzung der Stämme NY179 und NY503 (Nakamoto, Rao et al. 1991). Es handelt sich hierbei um Zellen des  $\alpha$  Paarungstyps, die sich nur mit diesen, nicht aber mit Zellen des Typ  $\alpha$ , paaren können. Der Hefestamm ist in der Lage in Galaktose-haltigem Medium zu wachsen. Weiterhin besitzt er eine Temperatur-sensitive Mutation im Stoffwechselweg der sekretorischen Vesikel (*sec6-4*). Die beiden defekten Gene *SEC6* und *SEC4* gehören zu einem Set aus 10 *SEC* (*secretory*) Genen, die am Vesikeltransport vom Golgiapparat zur Membran beteiligt sind. Während *SEC4* ein GTP bindendes Protein codiert, das mit der cytoplasmatischen Oberfläche der sekretorischen Vesikel assoziiert ist, codiert *SEC6* ein 85 kDa Protein, das für die Fusion der post-Golgi Vesikel mit der Plasmamembran verantwortlich ist (Potenza, Bowser et al. 1992). Als Folge einer Temperaturerhöhung von 25°C auf 37°C kommt es so zu einer Akkumulation von post-Golgivesikeln. Der Stamm wurde bereits zur Untersuchung von unterschiedlichen Membranproteinen eingesetzt (Nakamoto, Rao et al. 1991; Laize, Rousselet et al. 1995). Die exprimierten Membranproteine können durch Isolation der akkumulierenden sekretorischen Vesikel gewonnen-, und für funktionelle Analysen genutzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Hefezellen zunächst einer Temperaturveränderung in der Kultivierung ausgesetzt, und die akkumulierten Vesikel isoliert. Im späteren Verlauf der Arbeit wurde die Hefe bei 30°C angezogen und die Zellen im Ganzen verwendet.

### 2.4.2 Anzucht des SY1-Hefestammes

Die Kultivierung des untransformierten Hefestammes SY1 erfolgte auf YPD Agarplatten oder Flüssigmedium mit 2 % Glukose. Nach der Transformation wurde die Hefe auf speziellen Selektionsplatten bzw. –medium kultiviert. Das SC-Selektionsmedium enthält unter anderem eine spezielle Aminosäuremischung ohne Leucin und Uracil. Durch das Einbringen von Vektoren, die einmal für Leucin - (im Fall der Carboanhydrase) und für Uracil (alle anderen Aquaporinkonstrukte) codieren konnte so eine Selektion von positiven Doppeltransformanten erreicht und die Transformation durch den Selektionsdruck stabil gehalten werden. Generell wurde die Hefe mittels eines Verdünnungsausstriches auf Platten ausgebracht (Inkubation bei 30°C für 2-3 Tage).

<b>YPD-Medium:</b>	1 % Hefeextrakt (1 %)
	2 % Pepton (2 %)
	2 % Glukose
	1,5 % Agar (für YPD-Agar-Medium, Roth)

### 2.4.3 Kultivierung der Hefe für die Messungen mit dem *Stopped Flow* Spektrophotometer

Für die *Stopped Flow* spektrophotometrischen Experimente wurde von den Transformanten zunächst eine Kolonie von der Platte in 20 ml Selektionsmedium mit Glukose angeimpft und bei 30°C und 225 rpm über Nacht kultiviert. Unter sterilen Bedingungen wurde die Kultur dann in 50 ml Falconröhrchen überführt, bei 3000 rpm für 3 min. in einer Tischzentrifuge (Heraeus Multifuge 1 L-R) zentrifugiert und der Überstand entfernt. Zum waschen der Zellen wurde diese in 10 ml sterilem, autoklavierten *Aqua dest.* mittels vortexen resuspendiert und nochmals bei 3000 rpm 3 min. zentrifugiert. Auch dieser Überstand wurde verworfen. Die nun gewaschenen Hefezellen wurden nochmals in sterilem *Aqua dest.* resuspendiert und die Zelldichte

(OD<sub>600</sub>) spektrophotometrisch mit Hilfe eines Photometers (CO 8000 *Cell Density Meter*, WPA Biowave) bei 600 nm bestimmt. Die Proben wurden dafür 1 zu 20 verdünnt und gegen die Referenz (*Aqua dest.*) vermessen. Der OD-Wert gibt Aufschluss über die Anzahl der Teilchen pro Volumen. Um allen Hefetransformanten den gleichen Startpunkt zu geben, wurden die Zellen für die Gewinnung sekretorischer Vesikel mit einer OD von 1 steril in 500 ml Induktionsmedium mit Galaktose angeimpft und für 12 h zunächst bei 30°C und 225 rpm kultiviert. Dann wurden sie für 2 h bei 37°C weiterkultiviert. Für die Experimente mit den ganzen Hefezellen wurden diese nach der Anzucht im Glukose-Selektionsmedium abzentrifugiert, gewaschen und mit einer OD<sub>600</sub> von 0,6 in 20 ml Induktionsmedium angeimpft. Die Inkubation erfolgte dann für 14 h bei 30°C. Die Hefezellen wurden anschließend mit Fluoresceindiaceetat angefärbt.

**SC-Medium:**

0,5 % Ammoniumsulfat  
0,17 % Yeast Nitrogen Base (Becton Dickinson)  
2 % Glukose bzw. Galaktose  
1,15 g AS (aus 10x AS-Mix)  
1,5 % Agar (für SC-Agar-Medium; Roth)

**10x Aminosäure-Mix:**

0,01 % Adenin, Arginin, Cystein, Lysin, Threonin,  
(Leucin), (Uracil)  
0,005 % Aspartat, Histidin, Isoleucin, Methionin,  
Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin

#### 2.4.4 Transformation von SY1-Hefe mit der Hitzeschockmethode

Für die Transformation des Hefestammes SY1 wurde eine Methode nach der Firma Clontech (K1606-1) verwendet. Dazu wurden die Zellen in geeignetem Medium über Nacht bei 30°C und 225 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1 angezogen. Unter sterilen Bedingungen wurde die Hefe dann abzentrifugiert und einmal mit 0,1 M LiAc/0,1 M TE Lösung gewaschen. Nach dem erneuten Zentrifugieren wurde das Pellet in 500 µl der gleichen Lösung aufgenommen und bei 30°C und 125 rpm für 1 h inkubiert. Die so kompetent gemachten Zellen konnten bis zur Transformation bei RT oder für eine spätere Verwendung in einer 0,1M LiAc/0,1 M TE/15 % Glycerol Lösung bei -80°C gelagert werden. Für die Transformation wurde unter sterilen Bedingungen 50 µl Heringssperma DNA (2 mg/ml), 1 µg Plasmid-DNA oder im Fall des *Drag & Drop* (Jansen, Wu et al. 2005) 1 µg pGREG505 Vektor und gleichviel des aufgereinigten Genfragments sowie 100 µl der kompetenten Hefezellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und gut gemischt. Danach wurden 600 µl einer 5 % PEG/0,1 M LiAc/0,1 M TE Lösung hinzugegeben, gevortext und der Ansatz bei 30°C und 95 rpm für 30 min. inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 15 min bei 42°C im Wasserbad. Nach 1-2 min Abkühlung auf Eis wurden die Zellen in einer Tischzentrifuge bei 5000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 300 µl 1x TE Puffer gelöst und je 150 µl der Suspension auf Selektionsplatten ausgebracht. Die Kultivierung der Platten erfolgte dann bei 30°C. Nach ca. 2 Tagen konnten bei erfolgreicher Transformation erste Kolonien gesehen - und dann auf neuen Selektionsplatten per Verdünnungsausstrich weiterkultiviert werden.

**10x LiAc:** 1 M Litiumacetat

**10x TE:** 100 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA pH 7.0

40 % Glycerin autoklaviert

50 % PEG- Lösung autoklaviert

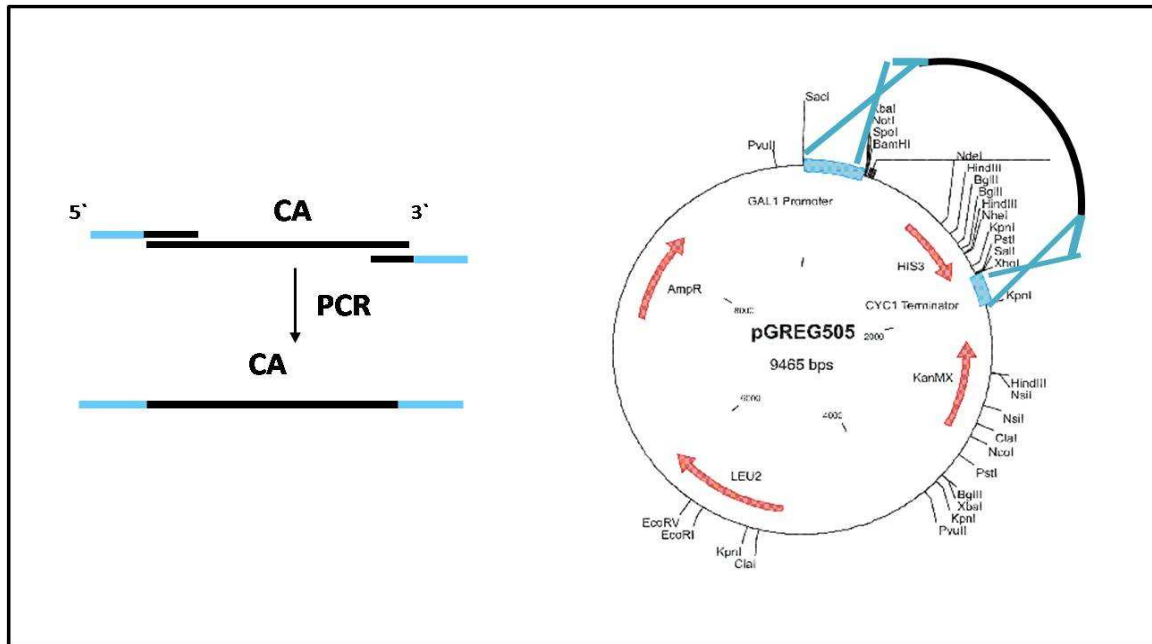
#### 2.4.5. Biolistische Transformation von SY1-Hefezellen

Für die biolistische Transformation von SY1-Hefezellen wurde das *Particle-Delivery-System* (PDS) 1000/He (Biorad) verwendet. Hierzu wurde eine Kultur von SY1-Hefe in YPD-Medium angeimpft und für 48 h bei 30°C inkubiert. Die Zellen sollten sich in der stationären Wachstumsphase befinden. Die Hefe wurde durch Zentrifugation (5 min, 500 x g, RT) geerntet, mit autoklavierten *Aqua dest.* gewaschen und in 3 ml autoklavierten *Aqua dest.* aufgenommen. 100 µl der Hefesuspension wurden in die Mitte einer Petrischale mit entsprechendem Agar-Selektionsmedium, zuzüglich 0,75 M Sorbitol und 0,75 M Mannitol, gegeben und in einem Radius von 2 cm plattiert. Die so präparierten Platten wurden nach dem Antrocknen der Hefezellen zur Transformation verwendet. Für die Beschichtung der Wolfram-Mikropartikel mit Plasmid-DNA und die anschließende Transformation der Hefezellen wurde nach dem Protokoll von Sanford *et al.* (Sanford, Smith et al. 1993) verfahren.

#### 2.4.6 Klonierung mittels *in vivo* Rekombination von Hefe (Drag & Drop)

Für die Klonierung der Tabak-Carboanhydrase in den pGREG505 Vektor, wurde das Drag & Drop System (Jansen, Wu et al. 2005) verwendet. Dazu wurden besondere Primer generiert, die neben den genspezifischen- noch 30 weitere zu Rekombinationsstellen auf dem Vektor passenden Nukleotiden enthielten (siehe 2.3.5, Tabelle 1). Mit diesen wurde dann das cDNA Fragment der Tabak-Carboanhydrase mittels PCR vervielfältigt und aufgereinigt. Der pGREG505 Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym Sal I linearisiert und ebenfalls gereinigt. Beides wurde dann mit der Litium Methode (siehe 2.4.4) in SY1 Hefe transformiert und diese über geeignete SC-Platten selektiert. Die Hefe ist *in vivo* in der Lage das cDNA Fragment über *cross over* (Genaustausch) der anhängenden Rekombinationsstücke mit denen auf dem Vektor liegenden Stellen einzubauen (Abbildung 2-I).





**Abbildung 2-I:** Schematische Darstellung der Klonierung der cDNA der Carboanhydrase in den pGREG505 Vektor über in vivo Rekombination in Hefe (Drag & Drop; (Jansen, Wu et al. 2005))

#### 2.4.7 Isolation von Plasmid-DNA aus Hefezellen

Um für eine Analyse Plasmid-DNA aus transformierten Hefezellen zu gewinnen, wurde das Protokoll von Robzyk *et al.* (Robzyk and Kassir 1992) verwendet. Dabei wurde eine 1,5 ml Übernachtskultur der Hefe unter selektiven Bedingungen angezogen und in einer Microfuge zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde dann in 100 µl STET Lösung resuspendiert und 0,2 g Glasskugeln (ø 0,45 mm, Sigma) hinzugegeben. Nach starkem vortexen des Reaktionsröhrchens für 5 min, wurden weitere 100 µl STET Lösung hinzugegeben und nochmals kurz gevortext. Der Ansatz wurde dann für 3 min. in ein kochendes Wasserbad gestellt. Anschließend wurde das Gefäß kurz auf Eis abgekühlt und dann für 10 min. bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden in ein neues Gefäß mit 50 µl einer 7,5 M Ammoniumacetatlösung überführt und für 1 h bei -20°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine 10 min. Zentrifugation in der Tischzentrifuge (Hermle Z 160 M). Um die Plasmide zu fällen wurden 100 µl des Überstandes zu 200 µl eiskaltem 100 % Ethanol gegeben und erneut zentrifugiert. Das Pellet konnte dann mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet werden.

Es wurde dann in 20 µl *Aqua dest.* aufgenommen. Die so gewonnenen Plasmide konnten für eine Rücktransformation in *E.coli* genutzt werden.

**STET- Lösung:**

- 8 % Saccharose
- 50 mM Tris/ HCl pH 8
- 50 mM EDTA
- 5 % Triton-X 100

### 2.4.8 Einfache Proteinisolation aus Hefe mittels säurebehandelten Glaskugeln

Diese Methode wurde wie in dem pYes-DEST 52 Gateway™ Manual (Invitrogen) beschrieben durchgeführt und in einigen Punkten modifiziert. Das Hefepellet wurde in 500 µl Aufschlusspuffer aufgenommen und mit 0,5 g säurebehandelten Glaskugeln (Ø 0,45 mm, Sigma) überschichtet. Danach wurde die Probe für 5 min stark gevortext und bei 14.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in 20 µl 4 x Probenpuffer (Rezept siehe 2.6.2) aufgenommen und anschließend auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

**Aufschlusspuffer:**

- 50 mM NaPO<sub>4</sub>
- 1 mM EDTA
- 5 % Glycerin
- 1 µg/ml Leupeptin
- 1 µg/ml Pepstatin

#### 2.4.9 Isolation von Hefe-Plasmamembranen

Die Isolation von Plasmamembranen aus Hefe wurde nach dem Protokoll (Nakamoto, Rao et al. 1991) durchgeführt. Die Hefe wurde dafür in geeignetem Selektionsmedium (siehe 2.4.3) angezogen, bei 500 x g und 4°C für 5 min. zentrifugiert (Heraeus LR-1). Anschließend wurden die Pellets in 5 ml Waschpuffer vollständig resuspendiert und mit dem Puffer auf 50 ml aufgefüllt. Die Ansätze wurden dann für 10 min bei 30°C und 225 rpm inkubiert und nach der Zeit erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 25 ml frisch angesetzttem Zymolyase-Medium resuspendiert und für 2 h bei 30°C und 125 rpm protoplastiert. Nach dieser Zeit erfolgte eine Zentrifugation bei 3000 x g und 4°C für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und ab jetzt alle weiteren Arbeiten auf Eis ausgeführt. Die Pellets wurden in je 5 ml Homogenisationsmedium gelöst und die gleiche Menge an Säure gewaschenen Glasskugeln (ø 0,45 mm; Sigma) hinzugegeben. Danach wurden die Ansätze für 2 min. stark gevortext und anschließend 2 min. auf Eis gekühlt. Nach viermaliger Wiederholung der Prozedur wurde der Überstand von den Ansätzen in ein anderes Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde mit Homogenisierungs-Medium nochmals mit Glasskugeln bearbeitet. Nach Vereinigung der Überstände wurden diese bei 2500 x g und 4°C für 10 min. zentrifugiert, um Zelltrümmer zu sedimentieren. Dann wurden die Membranen daraus mit Hilfe einer Ultrazentrifuge (Beckmann & Coulter) bei 120.000 x g und 4°C in 30 min. pelletiert. Das Membranpellet wurde in 500 µl 1,1 M Sukrosemedium resuspendiert und auf einen 1,65 M/2,25 M Sukrosemedium-Gradienten gegeben. Nach 1 h Zentrifugation bei 150.000 x g und 4°C in der Ultrazentrifuge wurden die Plasmamembranen aus der Interphase abgenommen und mit Sorbitol-Medium auf 10 ml verdünnt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei den Bedingungen wie zuvor für 30 min. Die sedimentierten Plasmamembranen konnten dann in Aufnahme-Medium resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert werden.

<b>Waschpuffer:</b>	0,1 M Tris/ HCl pH 9,5 50 mM 2-Mercapthoethanol 0,1 M Glukose
<b>Zymolyase-Medium:</b>	0,9 M Sorbitol 0,1 M Glukose 50 mM Tris/MES pH 7, 6 5 mM DTT (Roth) 0,043 % YNB (Becton Dickinson) 0,004 % AS-Mix (siehe 2.4.2) 0, 05 % Zymolyase (MP Biomedicals)
<b>Homogenisierungs-Medium:</b>	50 mM Tris/Ascorbat pH7,6 1,1 M Glycerol 1,5 % Polyvinylpyrrolidon (40.000) 5 mM EGTA 1 mM DTT 0,2 % BSA 1 µg/ ml Leupeptin/Pepstatin
<b>Sucrose-Medium:</b>	1,1/1,65/2,25 M Sucrose 5 mM Tris/HCl pH 7,6 2 mM DTT (Roth) 12,5 mM KCl 5 % Glycerol 0,1 % BSA (Roth) 1 µg/ml Pepstatin/Leupeptin
<b>Sorbitol- Medium:</b>	0,3 M Sorbitol 1 mM DTT 5 mM MgCl <sub>2</sub> 5 mM Tris/HCl pH 7,6

<b>Aufnahme- Medium:</b>	330 mM Sukrose
	5 mM KCl
	1 mM DTT (Roth)
	1 µg/ml Pepstatin/Leupeptin

## **2.5 Arbeiten mit Ribonukleinsäuren (RNA)**

### **2.5.1 Isolation von RNA aus Hefezellen**

Für die Gewinnung von RNA aus den SY1-Hefezellen wurden diese zunächst wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben in 50 ml SC-Medium mit Glukose bzw. Galaktose angezogen und zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde dann wie in 2.4.9 beschrieben in 5 ml Waschpuffer resuspendiert und für 10 min bei 30°C und 90 rpm inkubiert. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet in 5 ml frisch angesetztem Zymolyase-Medium resuspendiert und für 2 h bei 30°C und 125 rpm inkubiert. Nach dieser Zeit wurde erneut zentrifugiert und zu dem Pellet 1 ml Homogenisationsmedium, sowie die gleiche Menge Glasskügelchen hinzugefügt. Nach viermaligem starken vortexen für 2 min, unterbrochen von je 2 min auf Eis, wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und ein gleiches Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (50:50:1) hinzugegeben und gut durchmischt. Anschließend wurde der Ansatz für 3 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 200 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) hinzugegeben. Nach gutem Durchmischen wurde der Ansatz erneut für 3 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde erneut in ein neues Gefäß überführt und der vorige Schritt nochmals wiederholt. Zu der zuletzt abgenommenen Phase wurde dann 1 ml Isopropanol hinzugegeben und 2 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zum Fällern der RNA für 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Zum waschen wurde dann 1 ml eiskalter, 70 % iger Ethanol draufgegeben und für 10 min bei gleichbleibender rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig vollständig

entfernt und das Pellet getrocknet. Anschließend wurden 5 µl RNase freies, steriles Wasser draufgegeben. Bis zur Verwendung konnte die RNA bei -80°C gelagert werden. Die Bestimmung der Quantität der RNA erfolgte wie für DNA in 2.3.1 beschrieben mit dem Photometer, in einer 1:50 Verdünnung bei 260 nm. Für eine Northern-Hybridisierung wurde die RNA auf ein Agarose Gel aufgetragen.

### 2.5.2 Auftrennen von RNA mittels Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der RNA-Proben bzw. für die Northern Hybridisierung, wurde die RNA in einem 1 % igen, denaturierenden MEN-Agarosegel aufgetrennt. Dazu wurden je Probe 1 µg gesamt-RNA mit Wasser und RNA-Ladungspuffer auf ein gleiches Volumen gebracht und 10 min bei 65°C denaturiert. Nachdem die Proben 2 min auf Eis gekühlt waren, wurden sie auf das Gel aufgetragen und bei 80 V in 1 x MEN-Puffer aufgetrennt. Im RNA-Ladungspuffer befand sich Ethidiumbromid, das in die RNA interkalierte und nach Anregung durch UV-Licht Banden sichtbar machte. Die Analyse der Daten erfolgte mittels eines ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech).

<b>RNA-Ladungspuffer:</b>	0,72 ml Formamid
	0,16 ml 10 x MEN
	0,26 ml 37 % Formamid
	0,18 ml bidest. Wasser
	0,10 ml 80 % Glycerin
	0,08 ml 2 % Bromphenolblau
	3 µl 1 % Ethidiumbromid-Lösung

<b>10 x MEN-Puffer:</b>	0,2 M Morpholinopropansulfonsäure
	0,01 M EDTA
	0,05 M Natriumacetat

**MEN-Agarosegel:** 0,5 g Agarose (Roth)  
42,5 ml bidest. Wasser, wurde zusammen in der Mikrowelle aufgekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war; nach Abkühlung auf ca. 50–60°C wurde zugegeben:  
5 ml 10 x MEN  
2,7 ml 37 % Formaldehyd

### 2.5.3. Transfer von Gesamt-RNA auf eine Membran (Northern-Hybridsierung)

Der Transfer von RNA aus einem Agarosegel auf eine Membran wird als Northern-Hybridisierung bezeichnet. Dabei wird die RNA über Kapillarkräfte vom Gel auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham Life Science) transferiert. Dafür wurde das Gel nach Abschluss der Elektrophorese luftblasenfrei auf einer mit Transferpuffer (10 x SSC) getränkten Membran von der Größe des Gels und einem Stapel saugfähigen Papiers (ca.15 cm) so angeordnet, dass die Unterseite des Gels auf der Oberfläche der Membran zu liegen kam. Zwischen Gel und Pufferreservoir wurde durch auflegen eines Streifen Filterpapiers (Whatman 3MM) von der Breite des Gels und etwa 30 cm Länge eine Verbindung hergestellt. Der Transfer erfolgte über Nacht vertikal von oben nach unten. Anschließend wurde die RNA auf der Membran durch 120.000  $\mu$ Joules UV-Licht (UV Stratalinker 2400, Stratagene) fixiert.

**10 x SSC-Puffer:** 1,50 M NaCl  
0,15 M Na 3-Citrat, pH 7,0

#### 2.5.4 Herstellung einer DIG-11-UTP markierten cDNA Sonde

Für die Herstellung einer Sonde für die Detektion der Carboanhydrase mit Dioxigenin Uracil-Tri-Phosphat wurde nach dem Protokoll der Firma Roche verfahren. Es wurde der unten aufgeführte Ansatz mit Primern für die cDNA der Tabak-Carboanhydrase in einer Standard PCR (siehe 2.3.5) verwendet. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz ohne das DIG-11-UTP angesetzt. Die Überprüfung erfolgte in einem 1 % igem Agarose Gel (siehe 2.3.3). Bei erfolgreichem Einbau des DIG-11-UTP verlief die Bande etwas höher als die der Kontrolle.

PCR-Ansatz zur Markierung von cDNA-Sonden:

5 µl 10 x PCR Puffer (BioTherm)

1 µl dNTP-Mix (10 mM)

5 µl Dig-11-UTP (10 mM)

2,5 µl *sense*-Primer

2,5 µl *antisense*-Primer

50 ng Plasmid (Template)

1 µl Taq-Polymerase (Biotherm)

*Ad* 50 µl *Aqua dest.*

#### 2.5.5 Hybridisierung der Membran mit einer DIG-markierten Sonde

Für die Hybridisierung mit der mit DiG-11-UTP markierten Sonde (vervielfältigte cDNA der Tabak-Carboanhydrase) wurde das Protokoll, sowie alle Reagenzien von der Firma Roche verwendet. Vor dem Hybridisieren wurde die Membran in 2 x SSC/0,5 % SDS gewaschen. Für die Prähybridisierung wurde die Membran in ein Falconröhrchen (50 ml) überführt und mit 10 ml „DIG easy hyb“ in einem Rotor bei 42°C für mindestens 2 h vorhybridisiert. Für die folgende Hybridisierung wurden 10–20 ng pro ml Hybridisierungslösung der Sonde zu 100 µl „DIG easy hyb“ in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, 10 min bei 95°C denaturiert, für 2 min auf Eis gestellt und



anschließend zur Membran in das Röhrchen gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht (16 h) bei 42°C. Die Membran wurde unter Schütteln zweimal 15 min in 2 x SSC/0,1 % SDS bei Raumtemperatur und zweimal 15 min in 0,5 x SSC/0,1 % SDS bei 62°C im Wasserbad gewaschen. Dabei sollte der Waschpuffer auf 62°C vorgewärmt sein. Der letzte Waschschrift erhöht die Stringenz, d.h. nur die spezifisch gebundene Sonde blieb an der Membran haften, die unspezifisch gebundene Sonde wurde abgewaschen.

### **2.5.6 Nachweis mit einem Antikörper und Detektion**

Im Anschluss an die Hybridisierung wurde die Membran für 5 min im DIG-Waschpuffer bei RT equilibriert. Danach wurde sie in 10 ml DIG-Blockingpuffer (10 ml pro 10 cm<sup>2</sup> Membran) in einem Rotor bei RT geblockt. Der DIG-Antikörper wurde 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, 1 µl von der Oberfläche der Lösung abgenommen und mit 10 ml DIG-Blockingpuffer in einem Röhrchen vermischt. Die Membran wurde dann in dieses Röhrchen hinein gegeben und 1 h im Rotor bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran zwei Mal 15 min mit DIG-Waschpuffer unter schütteln gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran zunächst nochmal 5 min in DIG-Waschpuffer für 5 min gewaschen und dann auf einer Folie flach ausgelegt. Als Substrat wurde CDP-Star (Amersham) verwendet. Dieses wurde 1:50 mit DIG-Detektionspuffer verdünnt (1 ml pro 10 cm<sup>2</sup> Membran) und gleichmäßig auf der Membran verteilt. Nach 5 min Inkubation wurde die Lösung vorsichtig mit einem Zellpapier abgenommen und die Membran in Frischhaltefolie gewickelt. Die Visualisierung und Auswertung erfolgte mittels digitaler Geldokumentation mit dem *ChemiDoc<sup>TM</sup> XRS-System* (Bio-Rad). Die Membran war kurzfristig bei 4°C lager bar. Für die längere Aufbewahrung konnte die Sonde in 20 min in 0,1 % SDS bei 95°C herunter gewaschen - und die Membran dann in Frischhaltefolie eingeschlagen bei 4°C gelagert werden.

<b>Dig-Waschpuffer:</b>	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl 0,3 % Tween (frisch zugeben) pH 7,5
<b>Dig-Detektionspuffer:</b>	0,1 M Tris-HCl 0,1 M NaCl pH 9,5
<b>Dig-Blocking-Puffer:</b>	Stammlösung (Roche) wurde 1:10 mit Waschpuffer verdünnt (keine näheren Angaben)

## 2.6 Arbeiten mit Proteinen

### 2.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Proteinkonzentrationen in den isolierten Plasmamembranen zu bestimmen wurde nach dem Protokoll der RotiNanoquant® Lösung (Roth) verfahren. Als Stammlösung wurde eine BSA Lösung mit 400 µg/ml angesetzt. Die Membranen wurden 1 zu 40 mit *Aqua dest.* verdünnt. Zusätzlich wurde den Proben noch pro Ansatz 100 µl 1 M NaOH beigegeben, um die Membran zu denaturieren und so den Aquaporingehalt bestimmen zu können. Die Photometrische Messung (WPA biowave S2100, Biochrom) erfolgte bei 450 nm und 590 nm gegen *Aqua dest.* als Referenz. Durch Erstellung einer Eichgeraden (Auftrag des Quotienten 450 nm zu 590 nm gegen µg/ml BSA) konnte so die Proteinkonzentration ermittelt werden.

### 2.6.2 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung der Proteine wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE verwendet. Dabei bestand ein Fünftel des Gels aus einem weitporigen Sammelgel (5 % Polyacrylamid, pH 6,8) der Rest aus einem engmaschigen Trenngel (12,5 % Polyacrylamid, pH 8,8). Durch das Sammelgel wurden die Proteine zunächst auf einer Linie ankonzentriert, um dann im Trenngel gemäß ihren Molekulargewichten aufgetrennt zu werden. Die Gele wurden in einer Küvette, bestehend aus einer Aluminiumplatte, zwei Abstandhaltern und einer Glasscheibe in einer Gießapparatur gegossen. Bei dem verwendeten System (Minigel-System SE250, Hoefer) konnten mehrere Gele gleichzeitig hergestellt werden, die dann bis zu ihrer Verwendung in feuchte Tücher und Folie eingewickelt bei 4°C gelagert wurden. Für fünf Minigele (8 x 10 x 0,08 cm) wurde laut Pipettierschema in Tabelle 2 verfahren. Nach dem Gießen des Trenngels zwischen die Platten (Meniskus ca. 1,5 cm unterhalb der Aluminiumplatte) wurden die Oberflächen der Gele mit je 1 ml *Aqua. dest.* überschichtet um ein Austrocknen zu verhindern. Nach dem Auspolymerisieren der Gele wurde das Wasser vorsichtig abgenommen und die Sammelgellösung mittels einer Pipette in die verbleibenden Hohlräume eingebracht. Dabei wurden auch Probenauftragshilfen (Kämme) mit eingesetzt, sodass nach dem Auspolymerisieren Taschen für das Auftragen der Membranen vorhanden waren. Die Küvetten wurden in der Elektrophoresekammer mit zwei Klemmen befestigt und die Apparatur mit Elektrodenpuffer befüllt. Dann wurden die Kämme vorsichtig entfernt und die Taschen ebenfalls mit dem Elektrodenpuffer getränkt. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und mit 4 x Probenpuffer versetzt. Danach wurden sie nebeneinander in die Geltaschen aufgetragen. Als Standard für die Bestimmung der Molekulargewichte wurden 3 µl eines *Prestained* Markers (BioLabs) in eine der Taschen pipettiert. Die Elektroden der Gelkammer wurde an ein Spannungsgerät angeschlossen. Die Elektrophorese wurde dann bei 30 mA bis zum Austritt des Bromphenolblaus aus dem Gel durchgeführt. Nach Ende der Elektrophorese wurde die Küvette entfernt

und das Gel vorsichtig herausgelöst. Das Sammelgel wurde abgeschnitten und das Trenngel konnte gefärbt oder für einen Western Blot verwendet werden.

**Tabelle 2:** Zusammensetzung der Acrylamidgele für SDS-PAGE

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid-Stammlösung	10 ml	1,33 ml
4 x Trenngel-Puffer	7,5 ml	---
4 x Sammelgel-Puffer	---	2,5 ml
10 % SDS	0,3 ml	0,1 ml
H <sub>2</sub> O	12,16 ml	6 ml
1 % Bromphenolblau	---	5 µl
TEMED	10 µl	5 µl
40 % APS	0,38 ml	12,5 µl

**Acrylamid-Stammlösung:** Rotiphorese<sup>®</sup> Gel 40 (37,5:1 ;Roth)  
(40 % Acrylamid-Bisacrylamid mit Acrylamid:  
Bisacrylamid = 37,5:1)

**4 x Trenngel-Puffer:** 1,5 M Tris-HCl, pH 8, 8

**4 x Sammelgel-Puffer:** 0,5 M Tris-HCl, pH 6, 8

**10% SDS:** 10 % (w/v) SDS in H<sub>2</sub>O

**Bromphenolblau-Lösung:** 1 % Bromphenolblau in 10 mM Tris-HCl, pH 8

**40 % APS:** 40 % (w/v) APS in H<sub>2</sub>O

**Elektrodenpuffer:** 0,025 M Tris  
0,192 M Glycin,  
0,1 % SDS

<b>4 x Probenpuffer:</b>	0,25 M Tris-HCl, pH 6,8
	8 % SDS
	40 % Glycerin
	0,4 M DTT (Roth)
	0,2 % Bromphenolblau

### 2.6.3 Western Blot Analyse von Proteinen

Nach der Elektrophorese im SDS-Polyacrylamid-Gel wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe eines Tankblots (Hoefer TE 62, *tank transfer unit*, Amersham Bioscience) aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Protran® Nitrozellulose Transfer Membran, Schleicher & Schuell, Bio Science) übertragen. Die Blotapparatur wurde dafür in einem Tankblotgitter mit zwei feuchten Schwammtüchern aufgebaut. Das Whatman Filterpapier (Whatman Ltd.) sowie die Nitrozellulosemembran wurden vorher auf die Gelgröße (8,5 cm x 6 cm) zurechtgeschnitten und im Transferpuffer getränkt. Auf der Kathodenseite der verwendeten Blotapparatur wurden der Reihenfolge nach ein Schwammtuch, zwei Whatman Filterpapiere, das Trenngel, die Nitrozellulosemembran, wieder zwei Whatman Filterpapiere und zuletzt ein weiteres Schwammtuch gelegt. Um einen luftblasenfreien Transfer der Proteine auf die Membran zu ermöglichen, wurde mit einem Reagenzglas vorsichtig über die Schwammtücher gerollt. Das Gitter wurde verschlossen und in die Tankblotapparatur geschoben, die vorher mit 4°C gekühltem Transferpuffer gefüllt worden war. Der Transfer erfolgte bei 80 V für zwei Stunden. Während dieser Zeit war die Apparatur an eine Kühlanlage (Amersham Bioscience) angeschlossen, die eine konstante Temperatur von 10°C aufrecht hielt.

#### 2.6.4 Nachweis des Transfers von Proteinen auf eine Nitrozellulose-Membran

Zum Nachweis des Transfers der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde diese direkt nach dem Transfer kurz in Ponceau-Färbelösung eingelegt. Dieser Farbstoff bindet reversibel an Proteine. So konnte die Membran nach Visualisierung des Bandenmusters unter fließendem Wasser wieder entfärbt und anschließend für immunologische Nachweisverfahren eingesetzt werden.

**Ponceau-Färbelösung:**            0,2 %    Ponceau S (ICN, USA)  
                                                 5 %    Essigsäure

#### 2.6.5 Immunodetektion der Proteine durch Chemolumineszenz

Bei dieser Methode zur spezifischen Proteindetektion wurde das Tropix-System *Western-Light<sup>TM</sup>* und *Western-Star<sup>TM</sup>* (Applied Biosystems) verwendet, mit dem Proteinmengen von weniger als 1 pg nachgewiesen werden können. Dieses System beruht auf einem mit alkalischer Phosphatase gekoppelten sekundären Antikörper. Die Dephosphorylierung des Substrats CDP-*Star* durch das Enzym führt zur Bildung eines metastabilen Dioxetan Phenolat-Anions, welches zerfällt und in gepufferter Lösung Licht emittiert. Die Nitrozellulosemembran mit den gebundenen Proteinen wurde 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C zur Absättigung der unbesetzten Membranstellen in Blockpuffer auf einer Wippe geschwenkt. Zur folgenden Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Membran mit 1 ml einer adäquaten Verdünnung des Antikörpers (variiert für jeden Antikörper) in Blockpuffer luftblasenfrei in eine Plastikfolie eingeschweißt und für 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C liegen gelassen. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit ca. 30 ml Waschpuffer gewaschen. Nach den Waschschritten folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Der sekundäre Antikörper wurde in einer adäquaten Verdünnung in Blockpuffer eingesetzt. Die Inkubation erfolgt bei RT für 30 min auf

einem Wankelschüttler. Nachfolgend wurde die Membran zweimal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Es schloss sich eine Umpufferung mit zweimal 50 ml Assay B Puffer für 5 min an. Um den restlichen Puffer von der Membran ablaufen zu lassen wurde sie mit einer Ecke auf ein Papiertuch gelegt. Dann wurde sie auf eine Plastikfolie überführt, mit 1 ml Nitroblock-Lösung benetzt und für 5 min inkubiert. Die Lösung wurde vorsichtig abgegossen und die Membran mit 1 ml der Substrat-Lösung CDP-*Star* überschichtet. Anschließend wurde ebenfalls für 5 min inkubiert. Danach wurde die Membran in Folie gewickelt. Die Visualisierung und Auswertung erfolgte mittels digitaler Geldokumentation mit dem *ChemiDoc<sup>TM</sup> XRS-System* (Bio-Rad).

<b>Blockpuffer:</b>	5 % Magermilchpulver in Waschpuffer
<b>10 x PBS:</b>	82,3 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 23,5 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 40 g NaCl für 1 L bidest. H <sub>2</sub> O
<b>Waschpuffer:</b>	1 x PBS 0,5 % TWEEN 20
<b>10 x Assay B:</b>	200 mM Tris-HCl, pH 9,8 20 mM MgCl <sub>2</sub>
<b>Primärer Antikörper:</b>	anti- <i>Nt</i> AQP1 aus Huhn/ anti <i>Nt</i> PIP2 aus Kaninchen 1:500 Verdünnung 2 µl auf 1 ml Blockpuffer
<b>Sekundärer Antikörper:</b>	anti-Huhn IgY (Sigma)/ anti Kaninchen IgY (Sigma) 1:50.000 Verdünnung/ 1:30.000 Verdünnung In Blockpuffer angesetzt

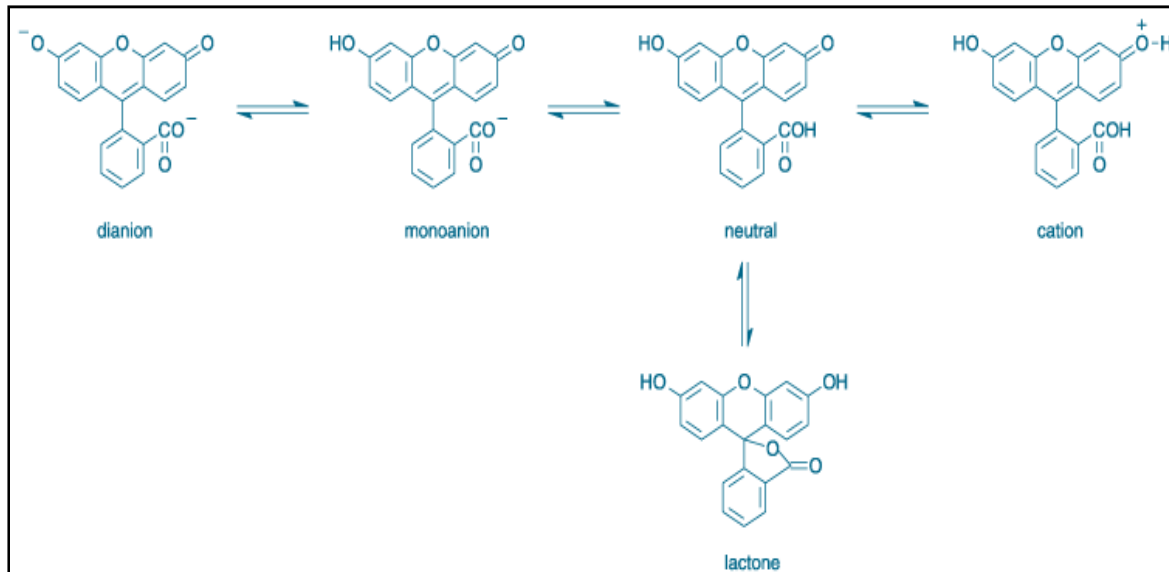
<b>Nitroblock-Lösung:</b>	50 µl Nitroblock (Applied Biosystems) Auf 950 µl 1x Assay B Puffer
<b>CDP-Star-Lösung:</b>	1 ml CDP-Star (12,5 mM; Applied Biosystems) 1:50 Verdünnung (Endkonzentration: 0,25 mM) 20 µl CDP-Star auf 980 µl 1x Assay B Puffer

## 2.7. Messung der CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit von Aquaporinen

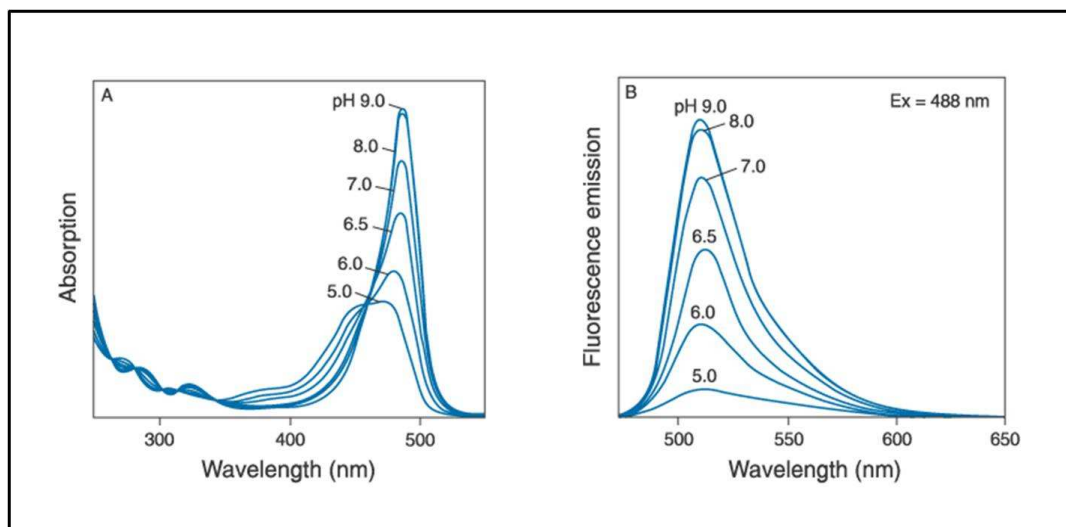
### 2.7.1 Die Farbstoffe Carboxyfluorescein (CF) und Fluoresceinbisacetat (FBA)

Um den Eintritt von CO<sub>2</sub> in die Hefezelle sichtbar zu machen bedient man sich pH-abhängiger Fluoreszenzfarbstoffe. In dieser Arbeit wurden zwei recht ähnliche verwendet. Sieht man von den chemischen Restgruppen ab, handelt es sich bei beiden um Fluorescein. Dieses hat die Eigenschaft je nach pH in unterschiedlichen Ionenzuständen vorzuliegen. Die Phenol- und Carboxylgruppen des Farbstoffes sind bei einem Umgebungs pH von 9 ionisiert. (Abbildung 2-II). Durch Ansäuerung des Mediums kann das Dianion zunächst an der phenolischen Gruppe zum Monoanion protoniert werden. Bei einem weiteren Abfall des pHs nimmt die Carboxylgruppe eine weitere positive Ladung auf und bildet das neutrale Molekül, welches noch in einen kationischen Zustand überführt werden kann. Nur das Dianion und das Monoanion des Farbstoffes zeigen die Eigenschaft der Fluoreszenz. Im Allgemeinen liegt in einem sauren Milieu mehrheitlich das Dianion und nur in geringem Maße das Monoanion vor. Dieses bestimmt auch das Fluoreszenzspektrum, in dem ein Blauverschiebung und die pH Abhängigkeit deutlich wird (Abbildung 2-III). Das Absorptionsspektrum nahe der Spitze für das Dianion bei 490 nm ist dabei unabhängig vom pH Wert, während die Fluoreszenz deutlich mit fallendem pH abnimmt (Abbildung 2-III).





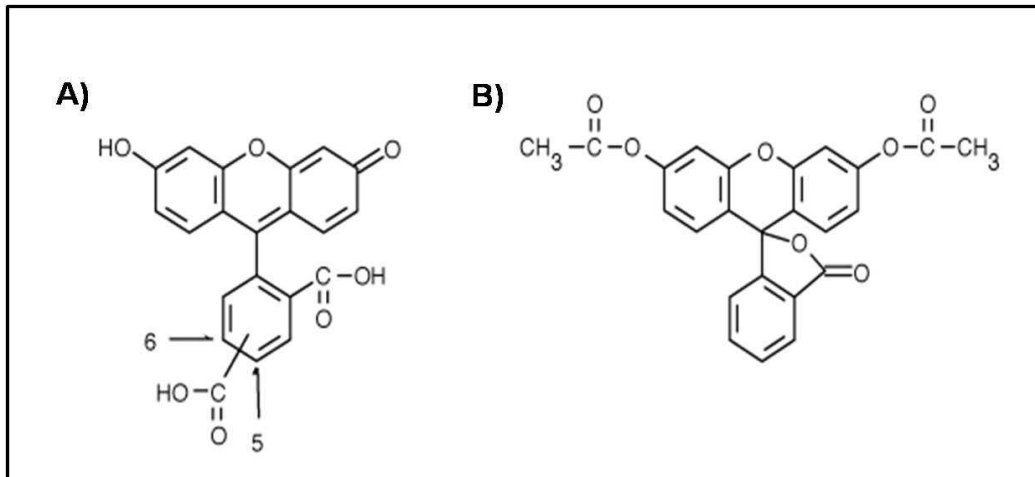
**Abbildung 2-II:** Verschiedene Ionenzustände des Fluorescein-Gerüsts bedingt durch unterschiedliche pH Werte der Umgebung. (Entnommen aus *Molekular Probes Handbuch*, Kapitel 20.2, Invitrogen)



**Abbildung 2-III: (A)** Absorptions- und **(B)** Emissionsspektrum des Fluoresceins bei verschiedenen pH-Werten (www.invitrogen.com).

Für die sekretorischen Hefevesikel wurde Carboxyfluorescein (CF) verwendet, welches neben dem schon beschriebenen Fluoresceingerüst noch über zwei weitere Carboxylgruppen verfügt (Abbildung 2-IV). Das Fluoresceinbisacetat (FBA) enthält am Fluorescein noch zwei Acetylgruppen, was es membrangängig macht. Die ganzen Hefezellen konnten so einfach in der Färbelösung inkubiert werden.

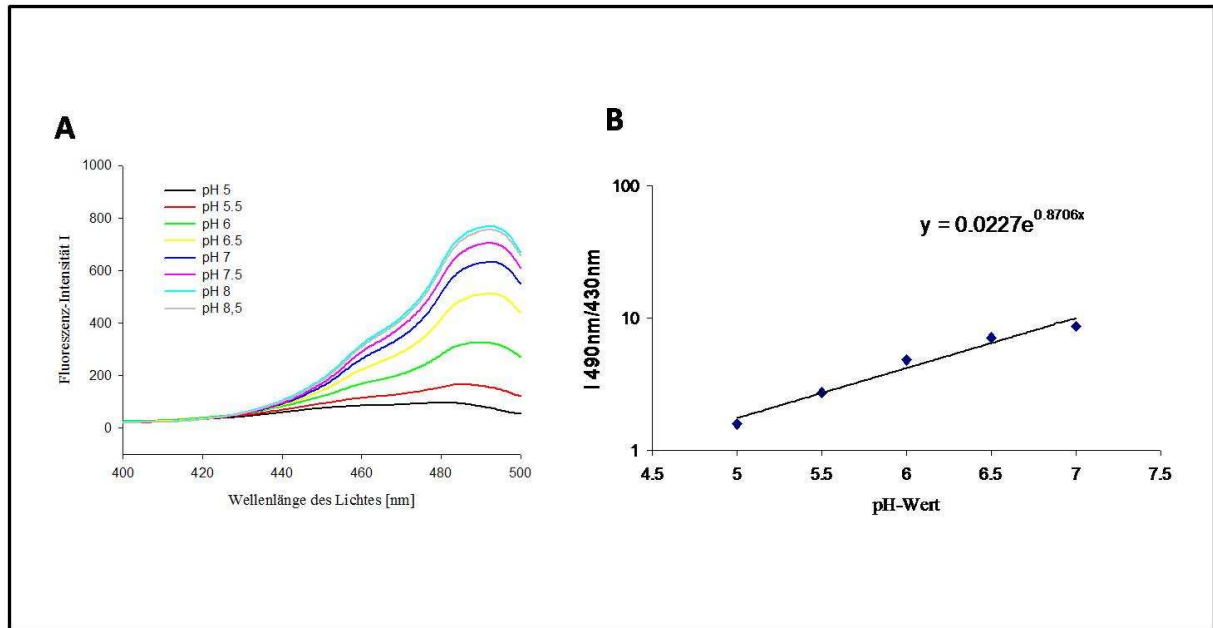
Durch das Abspalten der Acetylgruppen von Esterasen der Hefe wurde der Farbstoff in den Zellen fixiert, d.h. er konnte nicht mehr durch die Membranen nach draußen diffundieren. Um ein aktives Heraus transportieren des Farbstoffes in das Außenmedium seitens der Hefezellen zu verhindern, wurden sie nach dem Färben auf Eis gehalten.



**Abbildung 2-IV:** Chemische Strukturformeln des **A)** Carboxyfluorescein und **B)** des Fluoresceinbisacetat. (Entnommen aus *Molekular Probes* Handbuch Kapitel 20.2; Invitrogen)

### 2.7.2 Erstellung einer Fluoreszenz-Eichgerade für Fluoresceinbisacetat

Die Erstellung einer Fluoreszenz-Eichgerade erfolgte durch M. Fischer nach Slavik *et al.* (Slavik 1982). Die angefärbten Hefezellen wurden mit Puffern verschiedener pH-Werte gemischt und die Fluoreszenz mit einem Fluoreszenzspektrometer gemessen. Der Quotient der Fluoreszenzintensitäten von 490 nm zu 435 nm wurde logarithmisch gegen die pH-Werte aufgetragen (Abbildung 2-V).



**Abbildung 2-V:** Kalibrierung der pH abhängigen Fluoreszenz **A)** Spektren des Fluoresceins nach Mischung mit Puffern verschiedener pH-Werte **B)** Logarithmische Auftragung des Quotienten der Fluoreszenzintensitäten von 490 nm zu 435 nm gegen den pH-Wert (entnommen aus Fischer 2007)

### 2.7.3 Isolation sekretorischer Hefevesikel

Für die Isolation der sekretorischen Vesikel wurden die SY1-Hefetransformanten zunächst in Selektionsmedium mit Glukose und dann in Induktionsmedium mit Galaktose angezogen. Nach einer Inkubation von 12 h bei 30°C wurde die Temperatur für 2 h auf 37°C erhöht, was eine Anreicherung der sekretorischen Vesikel in den Hefezellen ermöglicht. Die Hefe wurde dann abzentrifugiert, das Pellet in 5 ml Lösung 1 resuspendiert und für 10 min bei RT geschüttelt. Die Ansätze wurden dann pelletiert (500 x g, 10 min) und in Lösung 2 mit Zymolyase aufgenommen. Der Abbau der Zellwände erfolgte dann in 1 h bei 37°C und 125 rpm auf einem Schüttler. Nach dieser Zeit wurde erneut zentrifugiert (1000 x g, 10 min) und die Protoplasten nochmals in Lösung 2 ohne Zymolyase aber mit  $\text{MgCl}_2$  und Concanavalin A gelöst. Es folgte eine Inkubation für 20 min bei 4°C und 90 rpm. In dieser Zeit sollten die Membranen der Vesikel durch das Concanavalin A stabilisiert werden. Die Vesikel wurden erneut pelletiert und in Lösung 3 mit 0,5 mM Carboxyfluorescein und 0,5 mg/ml boviner Carboanhydrase (Sigma) aufgenommen.

Anschließend wurden die Ansätze in einem eisgekühlten Glashomogenisator mit Hilfe eines Rührwerkes homogenisiert. Durch dieses Verfahren wurde erreicht, dass die Vesikel aufrissen und sich mit Lösung 3 füllten. Anschließend wurden sie bei 20.000 x g bei 4°C für 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Vesikel dann mit einer Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Optima 80K) für 1 h bei 4°C und 154.000 x g pelletiert. Die Vesikel konnten dann in geeignetem Messpuffer nach Yang *et al.* (Yang, Fukuda et al. 2000) aufgenommen werden.

<b>Lösung 1:</b>	10 mM Dithiotreitol (DTT; Roth) 100 mM TrisCl (pH 9,4)
<b>Lösung 2:</b>	1,4 M Sorbitol 50 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7,5) 10 mM NaNO <sub>3</sub> 40 mM Mercapthoethanol 217 µg/ml Zymolyase (20.000 Units MP Biomedicals) bzw. 10 mM MgCl <sub>2</sub> , Concanavalin A
<b>Lösung 3:</b>	0,8 M Sorbitol 10 mM TEA 1 mM EDTA (pH 7,2) 0,5 mM CF (Fluka), 0,5 mg/ml CA (Sigma aus Rind)
<b>Messpuffer:</b>	110 mM NaCl 5 mM KCl 25 mM HEPES eingestellt auf pH 7,4
<b>CO<sub>2</sub>- Puffer:</b>	60 mM NaCl 5 mM KCl 25 mm HEPES 50 mM NaHCO <sub>3</sub> über Nacht equilibriert und auf pH 7,4 eingestellt

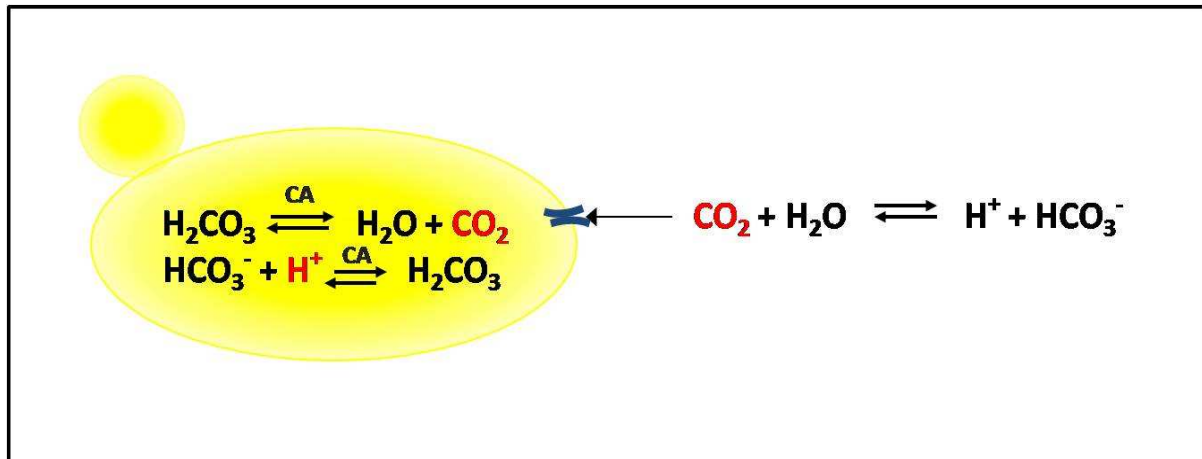
#### 2.7.4 Färben ganzer SY1-Hefezellen mit Fluoresceinbisacetat (FBA)

Für die CO<sub>2</sub>-Messungen wurde Hefe (transformiert mit Tabak-Carboanhydrase und unterschiedlichen Aquaporinkonstrukten) wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben erst in Selektionsmedium mit Glukose angezogen. Um den optimalen Induktionszeitpunkt zu ermitteln, wurden die Hefezellen dann für 10 h, 12 h, 14 h und 16 h in Galaktose-Medium weiterkultiviert. Da die Messung nach 14 h Induktion die besten Ergebnisse zeigte, wurde im Folgenden dieser Zeitraum für die Anzucht im Induktions-Medium mit Galaktose verwendet. Anschließend wurden die Ansätze bei 4°C für 3 min und 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Um Reste des Mediums zu entfernen wurden die Zentrifugenröhrchen kopfüber auf Zellpapier gestellt und vorsichtig ausgeklopft. Die Pellets wurden in 10 ml *Aqua dest* resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Auch hier wurde der Überstand vollständig entfernt. Dann wurde pro Ansatz 5 ml der Färbelösung draufgegeben, die Zellen resuspendiert und für 1 h bei 30°C und 125 rpm inkubiert. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle weiteren Arbeiten auf Eis ausgeführt. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 4°C und Verwerfen des Überstandes. Um restliches Fluoresceinbisacetat außerhalb der Hefezellen zu entfernen, wurden die nun leuchtend gelb gefärbten Pellets in eiskaltem Aufnahmepuffer gelöst und nochmals zentrifugiert. Auch hier wurde der Überstand restlos entfernt und die Pellets dann bis zu ihrer Verwendung auf Eis gelagert. Für die Messung wurden dann ca. 3 ml (richtete sich nach der Größe des Pellets) des Aufnahmepuffers auf die Zellen gegeben. Die gelb gefärbte Zellsuspension wurde dann in eine Spritze des *Stopped Flow* Spektrophotometers eingefüllt. In eine zweite Spritze wurde der Mischpuffer gegeben. Beide Lösungen konnten nun mit Hilfe der Apparatur unter definierten Bedingungen gemischt, und die Veränderung in der Fluoreszenz beobachtet und dokumentiert werden.

<b>Färbelösung:</b>	50 mM HEPES-NaOH (pH 7,0) 5 mM 2-deoxy-D-Glukose 50 $\mu$ M FBA (Stammlösung 5 mM in DMSO)* *(wird unter dem Namen Fluoresceindiacetat bei Aldrich vertrieben)
<b>Aufnahmepuffer:</b>	25 mM HEPES-NaOH (pH 7,0) 75 mM NaCl Auf pH 6 titriert
<b>CO<sub>2</sub>- Mischpuffer:</b>	25 mM HEPES-NaOH (pH 7,0) 75 mM Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )*  *(bzw. 50 mM, 25 mM, 20 mM, 15 mM für die Bestimmung der optimalen Pufferkonzentration) In einer geschlossenen Flasche über Nacht equilibriert und am nächsten Tag auf pH 6 eingestellt.

### 2.7.5 Das Prinzip der CO<sub>2</sub>-Messung

Wenn nun CO<sub>2</sub> aus dem Puffer durch die Aquaporine in das Zellinnere (oder ins Vesikel) gelangt wird es von der eingebrachten bzw. überexprimierten, Tabak-Carboanhydrase in Kohlensäure umgewandelt (Abbildung 2-VI). Das Zytosol der Zelle oder das Vesikelinnere wird dadurch angesäuert. Mit fallendem pH sinkt wegen der Eigenschaften des Fluoreszeinbisacetats (FBA) auch die Fluoreszenz. Dies kann mit Hilfe des *stopped Flow* Spektrophotometers detektiert und sichtbar gemacht werden. Die Geschwindigkeit mit der diese Reaktion abläuft ist dabei ein Maß für die Durchlässigkeit der Aquaporin-Konstrukte. Denn sind nach kurzer Zeit viele CO<sub>2</sub>-Moleküle vorhanden, werden diese durch das Enzym auch schnell umgesetzt. Weniger Substrat bedingt demnach eine geringere Umsatzrate und somit einen langsameren pH Abfall.

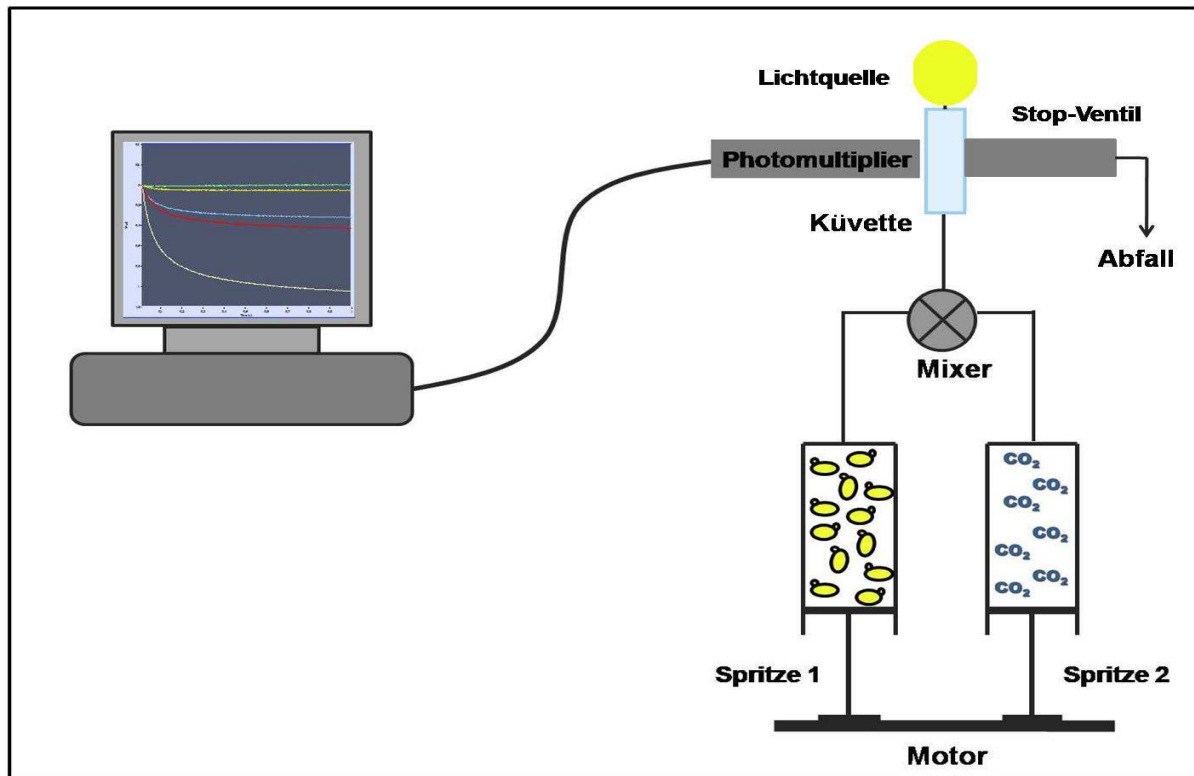


**Abbildung 2-VI:** Schematische Darstellung des Umsatzes an  $\text{CO}_2$  im Inneren der mit FBA gefärbten SY1 Hefezelle (bzw. eines Vesikels mit CF) durch Carboanhydrase (Tabak oder bovin), was die Grundlage für die Messung mit dem *Stopped Flow* Spektrophotometer bildet.

### 2.7.6 Das *Stopped Flow* Spektrophotometer

Für die Messung wurde eine sogenannte *stopped Flow* Spektrophotometer Apparatur (FM-300; BioLogic; Abbildung 2-VII) verwendet. Sie besteht aus einem Turm, in den drei motorbetriebene Spritzen (Volumen 10 ml) eingelassen sind. Diese können durch ein angeschlossenes Wasserbad mit Umwälzpumpe temperiert werden. Über dünne Kanäle in denen sich kleine rotierende Mischer befinden sind sie mit einer Küvette (FC-08) verbunden an die sich eine weitere Spritze anschließt. Wird das Flüssigkeitsgemisch in diese Spritze gedrückt, berührt ihr Stempel einen Kontakt der die Motoren der anderen Spritzen und damit den weiteren Einstrom stoppt. Die Reaktion kann dann in der Küvette aufgenommen werden. Sie wird dabei mit monochromatischem Licht (Wellenlänge 490 nm) einer Xenon/Quecksilber Lampe beleuchtet. Im  $90^\circ$  Winkel dazu befindet sich der sogenannte *Photomultiplier* mit einem 505 nm *cut off* Filter. Durch diesen Filter werden alle Signale, die über der Wellenlänge 505 nm liegen herausgefiltert. Alle anderen Fluoreszenzsignale und die Änderung ihrer Intensität werden weiter geleitet und durch den Multiplier von einem Lichtsignal in ein Spannungssignal umgewandelt. Der Computer zeigt dies in einer Grafik an, in der die Voltanzahl (V) gegen die Zeit aufgetragen ist. Die Datenaufnahme

wird dabei durch den Kontakt an der Stoppspritze gestartet und zeichnet die einzelnen Datenpunkte (ergeben gesamt eine Kurve) auf. Die Daten konnten dann mit Hilfe der *BioKine* (BioLogic) Software des Gerätes analysiert werden.



**Abbildung 2-VII:** Schematische Darstellung des Aufbaus für Messungen mit dem *Stopped Flow* Spektrophotometer.

### 2.7.7 Die Einstellungen an der *Stopped Flow* Apparatur

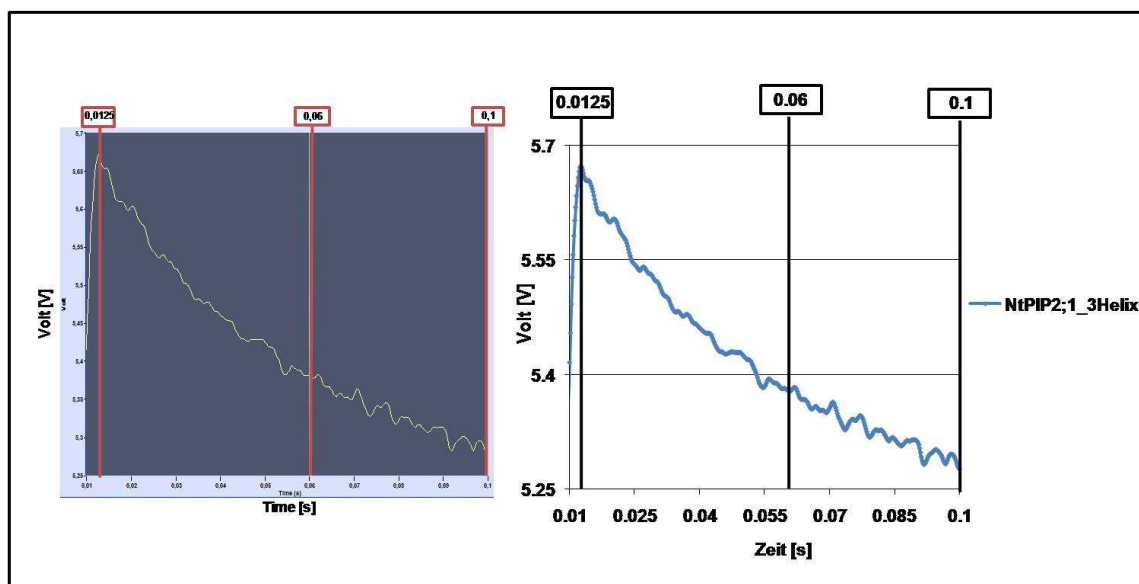
Für die Messung in dieser Arbeit wurden die Spritzen mit dem Wasserbad auf 10°C temperiert. Die mit Fluorescein beladenen Zellen, die verschiedene Konstrukte exprimierten, wurden mit dem gleichen Volumen an CO<sub>2</sub>-equilibrierten Puffer gemischt (je 100 µl pro Analyse). Die Fließgeschwindigkeit betrug dabei 10 ml/s, was einer Totzeit (Zeit in der die Reaktion durch die Mischung nicht detektiert werden kann) von 1,6 ms entspricht. Um den Anfang der Kurven und damit der Reaktion besser sehen zu können wurde die Datenaufnahme schon 10 ms bevor der Flüssigkeitsstrom beendet war gestartet. Als Zeitskala wurde am Beginn alle 200 µs -



und nachfolgend alle 2 ms ein Datenpunkt (gesamt 8000) aufgenommen. Pro Konstrukt wurden in einer Messung dreißig Kurven gespeichert, die später einzeln ausgewertet wurden. Insgesamt wurden in dieser Arbeit 4000 Kurven berücksichtigt.

## 2.8 Auswertung der Daten

Die ermittelten Daten wurden mit Hilfe der Software *BioKine* Version 4.27 der Firma *BioLogic* ausgewertet. Dazu wurden die einzelnen Kurven aufgerufen und Grenzen festgelegt, in denen der Rechner eine Kurvenanpassung vornehmen sollte. Die erste Grenze wurde auf den Start der Kurve nach dem Mischen gelegt, die mittlere auf 0,06 Sekunden und der Endpunkt auf 0,1 Sekunde (siehe Abbildung 2-VIII). Der kurze Zeitraum wurde gewählt, um sekundäre Prozesse von der Auswertung der Kurven auszuschließen. So könnte sich durch den Umsatz des schnell eingeströmten CO<sub>2</sub> durch die Carboanhydrase ein Konzentrationsgradient aufbauen. Diesem folgend würde CO<sub>2</sub> nach einiger Zeit dann auch passiv in die Zelle gelangen (Cooper, Zhou *et al.* 2002).



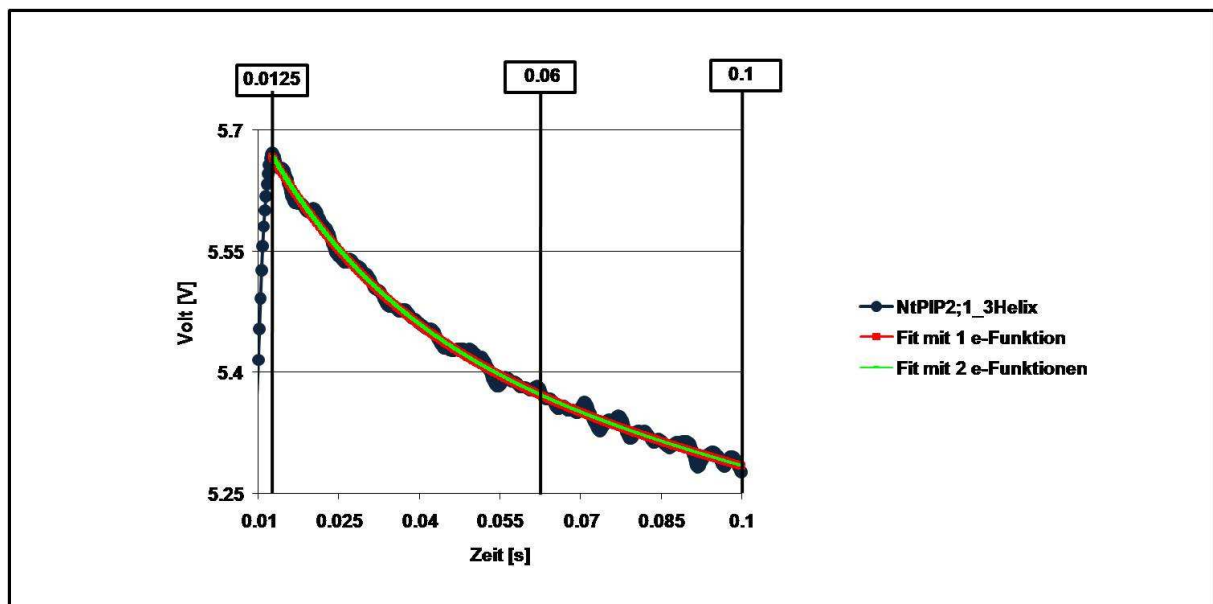
**Abbildung 2-VIII:** Verkleinerte Darstellung einer original-Kurve für eine CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeits-Messung mit Hefe die das Konstrukt NtPIP2;1\_3Helix und Carboanhydrase enthielt (links). In rot eingezeichnet sind die Grenzen, in denen die Kurvenanpassung von dem Programm *BioKine* berechnet werden sollte. Zur besseren Übersicht wurde dieselbe Kurve rechts nochmals in Excel mit den Zeitgrenzen grafisch dargestellt.

Mittels der *Multiexponential*- und der *Simplex*-Funktion des *BioKine* Programmes sollte die Kurve nun anhand einer Gleichung in den festgelegten Zeitgrenzen angepasst (*gefittet*) werden (Abbildung 2-IX).

$$Y = at + b + \sum_{i=1}^N c_i e^{-k_i t}$$

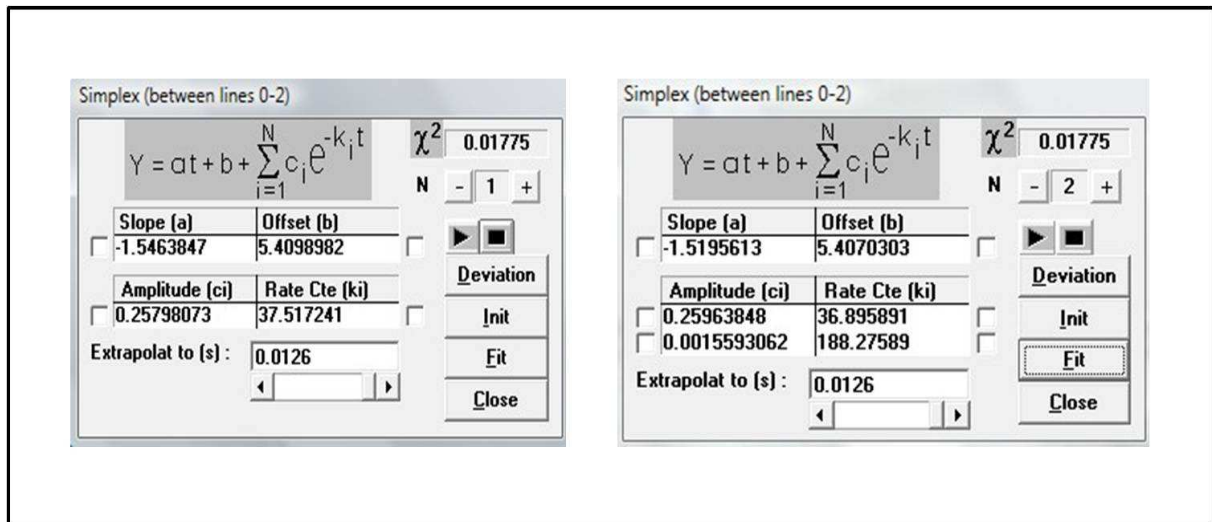
**Abbildung 2-IX:** Funktion anhand der die Kurvenanpassung durch das *BioKine* Programm durchgeführt wird. Der vordere Teil der Gleichung ( $at + b$ ) beschreibt dabei die lineare - der hintere die Summe der exponentiellen Komponenten.

Bei der Kurvenanpassung war es möglich dem Rechnerprogramm die Anzahl der exponentiellen (e-) Funktionen, mit denen die Kurve beschrieben werden sollte, vorzugeben. Es wurde zum Vergleich sowohl eine Anpassung mit einer - wie auch mit zwei e-Funktionen durchgeführt (Abbildung 2-X).



**Abbildung 2-X:** Grafische Darstellung der bereits in Abbildung 2-VIII aufgezeigten Kurve der Hefe mit NtPIP2;1\_3Helix und der beiden durch das *BioKine*-Programm nach der Gleichung 2-IX berechneten Kurvenanpassungen (*Fits*). Dabei zeigt sich nur ein minimaler Unterschied zwischen der Verwendung von einer- (rot) oder zwei (grün) e-Funktionen.

Als Ergebnis wurde jeweils u.a. die Ratenkonstante  $k$  (in  $s^{-1}$ ) ausgegeben, die ein Maß für die Schnelligkeit der abgelaufenen Reaktion ist. Bei der Anpassung mit zwei e-Funktionen muss dabei der obere  $k$ -Wert betrachtet werden, da er den ersten Bereich der Kurve beschreibt. In dem berücksichtigten Zeitraum zeigten sich nur minimale Unterschiede in dem Wert der Ratenkonstante zwischen den beiden unterschiedlichen Kurvenanpassungen (Abbildung 2-XI). Daher wurde dem Programm für die weitere Auswertung nur eine e-Funktion vorgegeben.



**Abbildung 2-XI:** Gegenüberstellung der durch das *BioKine*-Programm ausgegebenen Werte. Links nach einer Kurvenanpassung mit einer- ( $N=1$ ), rechts mit zwei e-Funktionen ( $N=2$ ). Es zeigen sich nur geringe Unterschiede in den Werten der Ratenkonstanten (vom Programm mit  $k_i$  bezeichnet).

Die daraus erhaltenen Werte der Ratenkonstanten wurden dann in Excel eingegeben und mit Hilfe von WinSTAT® (R. Fitch Software) weiter bearbeitet. Der Wert für den intrazellulären pH ( $pH_f$ ) wurde über eine Fluoreszenzspektrometrische Messung und eine Eichgerade des Farbstoffes bestimmt (siehe 2.7.2). Bei dem  $pK_a$  Wert handelt es sich um den chemischen Listenwert der den negativen Logarithmus der Gleichgewichtskonstanten für Kohlensäure ( $H_2CO_3$ ) beschreibt. In diesem Fall ist der  $pK_a$  für  $HCO_3^-$  gleich 6,1. Die Oberfläche  $S$  (engl. *Surface*;  $S = \pi r^2 = 6,55 \cdot 10^{-11}$ ) und das Volumen  $V$  ( $V = \frac{4}{3} \pi r^3 = 7,8 \cdot 10^{-7}$ ) der Zellen wurde zur Vereinfachung aus der

Mikroskopischen Vermessung von Hefeprotoplasten ( $\varnothing$  5  $\mu$ m) errechnet. Mit diesen Werten und den zuvor ermittelten Ratenkonstanten wurde dann der Permeabilitätskoeffizient  $P_{CO_2}$  (cm/s) (Abbildung 2-XII) nach Yang *et al.* (Yang, Fukuda *et al.* 2000) berechnet und statistisch analysiert. Der Koeffizient ist ein Maß für die Schnelligkeit, mit der das  $CO_2$  durch die Aquaporinkonstrukte gelangt. Je höher der Wert ist, desto leitfähiger ist das Protein.

$$P_{CO_2} = \frac{k * [10^{(pH_f - pka)}]}{\left(\frac{S}{V}\right)}$$

**Abbildung 2-XII:** Mathematische Formel für die Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten  $P_{CO_2}$ , umgeformt nach Yang *et al.*. Dabei ist k die ermittelte Ratenkonstante, pH<sub>f</sub> der finale intrazelluläre pH, pka der chemische Listenwert für den negativen Logarithmus der Dissoziationskonstante für Kohlensäure  $H_2CO_3$  (= 6,1) und S/V der Quotient aus Zelloberfläche zu Volumen.

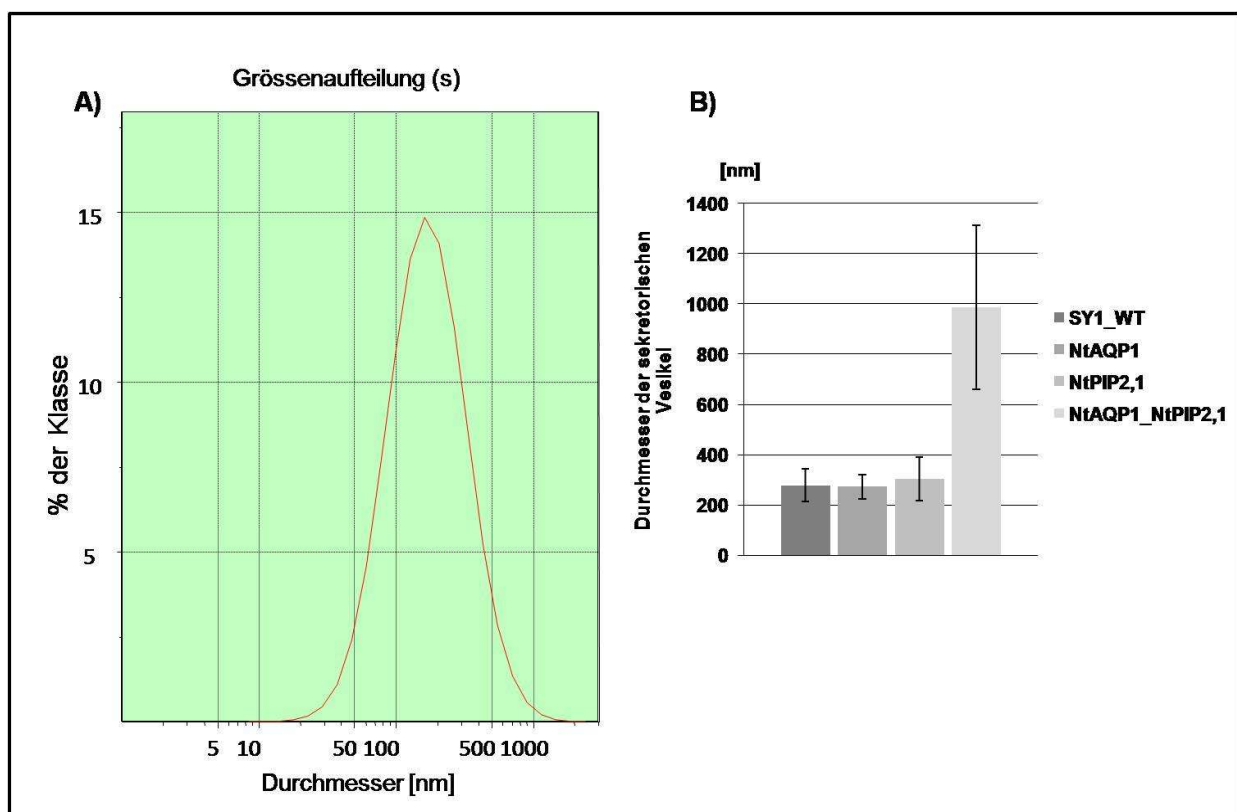
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Verwendung sekretorischer Hefevesikel

##### 3.1.1 Größenbestimmung der sekretorischen Hefevesikel

Die Gas-Leitfähigkeit tierischer Aquaporine, wie auch des menschlichen HsAQP1, wurde bereits mit verschiedenen Systemen untersucht. Unter anderem wurden Messungen mit künstlich hergestellten Proteoliposomen bzw. Vesikeln aus Membranen tierischen Gewebes durchgeführt (Priver, Rabon et al. 1993; Prasad, Coury et al. 1998). Die Methoden dieser Untersuchungen dienten unter anderem als Grundlage für die Optimierung des Systems der Sekretorischen Hefevesikel für Messungen der CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit pflanzlicher Aquaporine. So wurden die Messungen mit dem *Stopped Flow* Spektrophotometer mit von Prasad et al. (Prasad, Coury et al. 1998) verwendeten Puffern durchgeführt. Die Verwendung der sekretorischen Vesikel des Hefestammes SY1 wurde bereits für Analysen der H<sub>2</sub>O-Leitfähigkeit mit dem *Stopped Flow* Spektrophotometer etabliert (Coury, Mathai et al. 1998). Die SY1-Hefe wurde nun mit dem schon als CO<sub>2</sub>-permeabel charakterisierten NtAQP1 (Uehlein, Lovisolo et al. 2003), dem hoch wasserleitenden NtPIP2;1 und einem Fusionsprotein aus diesen beiden (NtAQP1/NtPIP2;1) transformiert. Als Kontrolle diente der untransformierte SY1 wildtyp. Nach der Anzucht in Induktionsmedium erst bei 30°C und dann bei 37°C, wurden die sekretorischen Vesikel isoliert. Von diesen wurde dann die Größe mittels einer dynamischen Messung der Lichtstreuung, basierend auf der Brown'schen Molekularbewegung der Vesikel bestimmt (Zetasizer, Malvern). Dabei zeigten sich für die Kontroll-Vesikel des Wildtyps, für die Probe mit NtAQP1 und NtPIP2;1 unterschiedliche Durchmesser (Abbildung 3-I). Diese liegen aber unter der Berücksichtigung des Standardfehlers in einem Bereich. Auffällig ist dagegen das Ergebnis für die Größenbestimmung der Vesikel mit dem Fusionsprotein aus NtAQP1 und NtPIP2;1. Dieses zeigt einen in etwa dreimal so hohen Durchmesser, wie die der anderen Vesikel.

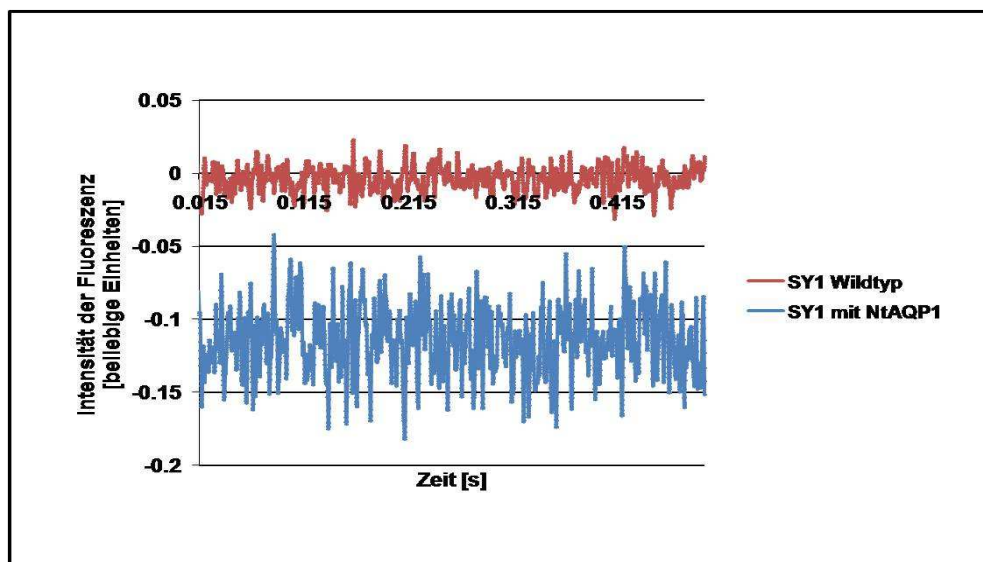
Auch liegt der Standardfehler bei dieser Messung enorm hoch. Es besteht hier die Möglichkeit, dass sich die Vesikel dieser Präparation aggregiert haben, weil sie nicht vollständig resuspendiert waren. Dies würde die Messung beeinträchtigen. Da diese Werte in die Berechnungen des Permeabilitätskoeffizienten  $P_{CO_2}$  für das jeweilige Konstrukt mit einbezogen werden sollten, wurde als Größe der Mittelwert des Durchmessers aus den drei in einem Bereich liegenden Messungen ( $\cong 285$  nm) festgelegt.



**Abbildung 3-I:** **A)** Beispieldarstellung einer Gauß'schen Verteilung des Durchmessers von sekretorischen Vesikeln von SY1-Hefe, transformiert mit NtPIP2;1 wie sie von dem verwendeten Gerät (Zetasizer, Malvern) ausgegeben wird. **B)** Auftrag der gemittelten Durchmesser der sekretorischen Vesikel der Hefen mit den verschiedenen Aquaporin-Konstrukten.

### 3.1.2. Erste Messungen der CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit der sekretorischen Vesikel mittels Stopped Flow Spektrometrie

Die sekretorischen Vesikel wurden für die Untersuchungen mit 1 mM Carboxyfluorescein (CF) und 0,5 mg/ml boviner Carboanhydrase (CA) beladen. Nach der Mischung in der Apparatur zeigten sich zunächst keine Kurvenverläufe, die auf eine Ansäuerung des Vesikelinneren und damit auf einen Umsatz des Kohlendioxids durch die Carboanhydrase schließen ließen (Abbildung 3-II). Dies konnte jedoch durch Optimierung der Einstellungen an dem Messgerät behoben werden.

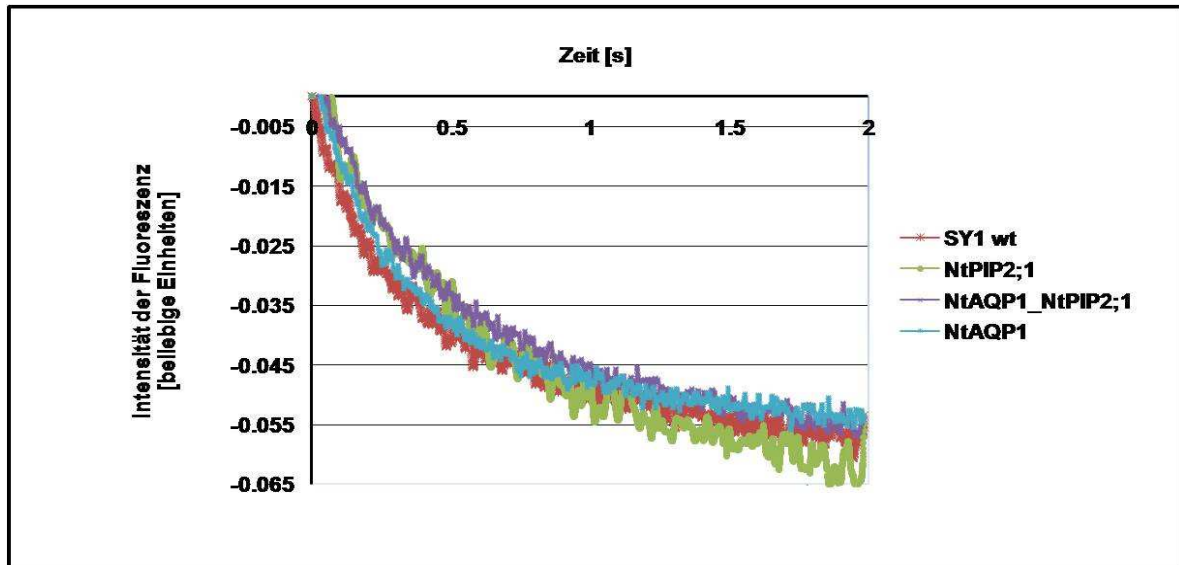


**Abbildung 3-II:** Beispielhafte Darstellung der Fluoreszenzintensität einer CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeits Messung mit sekretorischen Hefevesikeln von zwei unterschiedlich transformierten *Saccharomyces cerevisiae* SY1 Klonen.

### 3.1.3 Optimierte Messung der CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit mit sekretorischen Hefe Vesikeln

Nach der Optimierung der Einstellungen an der Apparatur des *Stopped Flow* Spektrophotometers konnten Kurvenverläufe aufgezeichnet werden. Allerdings wiesen die Kurven trotz guter Beladung der Vesikel durch das Carboxyfluorescein (CF) nur eine sehr geringe Amplitude auf (Abbildung 3-III). Die Verwendung verschiedener Mengen des Fluoreszenzfarbstoffes und der bovinen Carboanhydrase konnten dieses Problem nicht beheben. Auch die Einstellung der Vesikelsuspension auf verschiedene dichtere OD<sub>600</sub> führte zu keinem besseren Ergebnis. Dies machte eine vernünftige Auswertung der Daten durch Kurvenanpassung mit dem BioKine Programm (BioLogic) in dem durch verschiedene Arbeitsgruppen (Prasad, Coury et al. 1998; Yang, Fukuda et al. 2000) betrachteten schnellen Zeitraum bis ca. 0,1 Sekunde unmöglich. Das Hefevesikel System war in dieser Form demnach nicht für die Bestimmung der CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit pflanzlicher Aquaporine verwendbar. Daher wurde die Strategie gewechselt. Es wurden nun ganze Hefezellen für die CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeits-Messungen mit dem *Stopped Flow* Spektrophotometer verwendet. Hierzu bestehen bereits einige Untersuchungen auch von pflanzlichen Aquaporinen, die aber die Wasserleitfähigkeit (Maurel, Tacnet et al. 1997; Soveral, Madeira et al. 2007) oder die Ammoniumpermeabilität (Bertl und Kaldenhoff 2007) zum Ziel hatten. Diese dienten als Grundlagen, um das System für die Messung der CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit pflanzlicher Aquaporine mit Hilfe ganzer Hefezellen anzupassen.





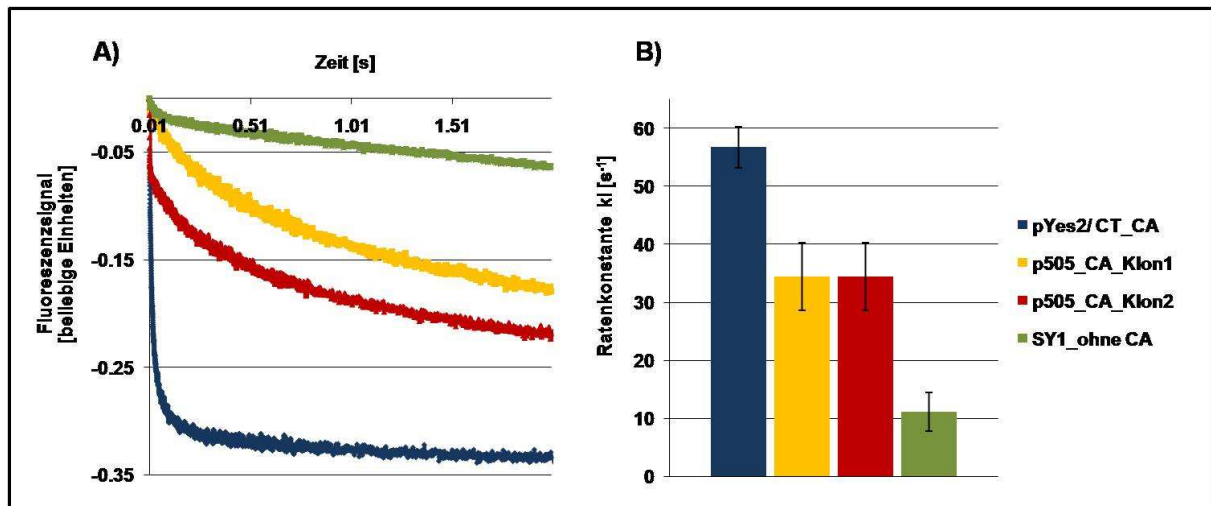
**Abbildung 3-III:** Fluoreszenzintensitäten einer CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeitsmessung sekretorischer Hefevesikel mit verschiedenen Aquaporin-Konstrukten nach Optimierung der Einstellungen am *Stopped Flow* Spektrophotometer.

### 3.2 Verwendung der Tabak-Carboanhydrase für das Hefesystem

Für die Messung der CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit pflanzlicher Aquaporine mit Hilfe ganzer Hefezellen wurde ebenfalls das Enzym Carboanhydrase verwendet. Dieses sollte wie bei den Vesikeln die Umsetzung des durch die Aquaporine einströmenden CO<sub>2</sub> in Kohlensäure beschleunigen, was zu einem Absinken des internen Zell-pH und damit zur Abnahme der Fluoreszenz des Farbstoffes führt. Damit konnte indirekt über die Abnahme der Fluoreszenz auf die Leitfähigkeit der Aquaporine geschlossen werden. Verwendet wurde Tabak-Carboanhydrase (EC 4.2.1.1 (Majeau und Coleman 1992)), die schon in einem Hefeexpressionsvektor vorlag. Dieser Vektor enthielt jedoch den gleichen auxotrophen Aminosäure-Marker, wie die Vektoren sämtlicher in dieser Arbeit verwendeter Aquaporin-Konstrukte (Uracil). Dieser befähigt die Hefezellen auf Medium ohne Uracil zu wachsen, da das Gen für die Synthese der Aminosäure auf dem Vektor enthalten ist. Um eine sichere Selektion zu ermöglichen wurde die Tabak-Carboanhydrase daher in einen Vektor mit einem anderen Aminosäure-Marker kloniert und Doppeltransformanten hergestellt.

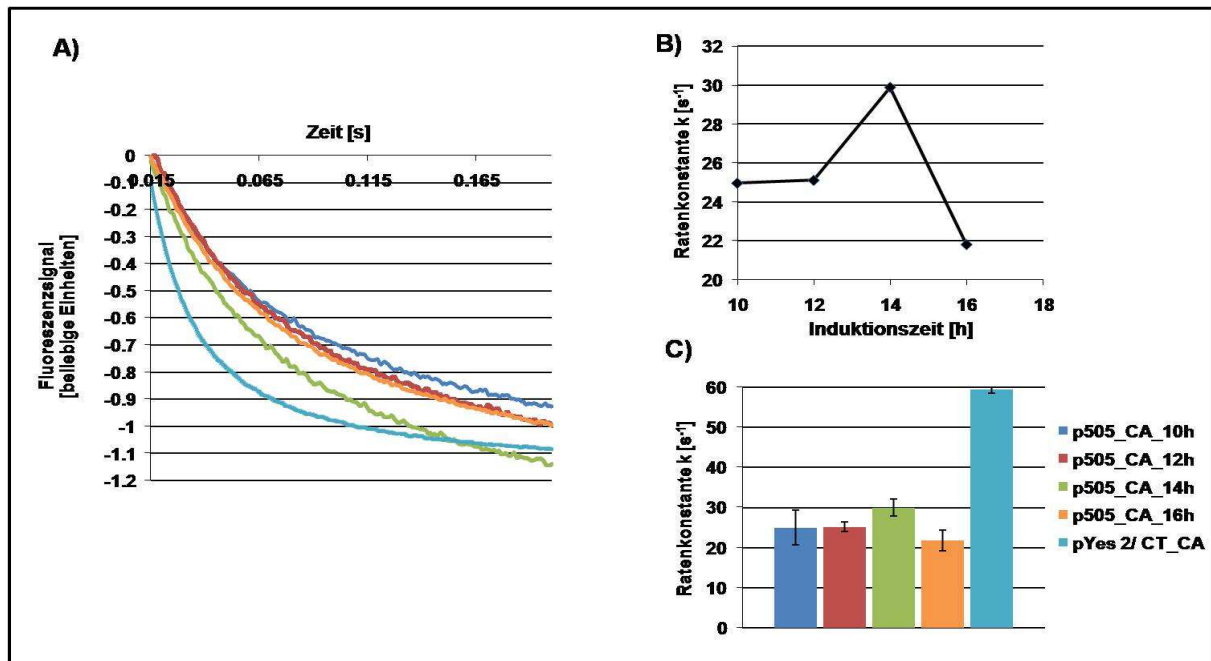
### 3.2.1 Klonierung der Tabak-Carboanhydrase (CA) in pGREG 505 (Euroscarf)

Der verfügbare, zunächst verwendete Hefeexpressionsvektor pGREG505 (Euroscarf; <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>) gehört zu den sogenannten *low copy* (in wenig Kopien vorliegenden) Plasmiden, die sich nur 10-20 Mal in einer Zelle replizieren. Daneben verfügt er neben Leucin als Selektions-Marker auch über einen starken induzierbaren Galaktose Promotor (GAL1). Damit besteht die Möglichkeit die Expression bei der Anzucht gezielt anzuschalten. Eine eventuelle Beeinträchtigung des Wachstums der Hefe durch das Vorhanden sein des Enzyms wird so vermieden. Die Klonierung der cDNA der Tabak-Carboanhydrase (CA) erfolgte zunächst über homologe Rekombination in den Hefeexpressionsvektor (Jansen, Wu et al. 2005). Das über PCR vervielfältigte cDNA-Fragment der Carboanhydrase sollte das zwischen den Rekombinationsstellen liegende HIS3 für den Histidinstoffwechsel verdrängen. Dies ermöglicht nach Jansen et al. (Jansen, Wu et al. 2005) neben der Selektion auf Agar-Platten ohne Leucin eine weitere Kontrolle des Austausches über Histidin als weiteren Selektions-Marker. In dieser Arbeit war es jedoch nicht möglich dieses zweite Selektionssystem zu nutzen, da der Hefestamm SY1 über eine Mutation im His4 Gen des Histidinstoffwechsels verfügt. Dieses Gen codiert u.a. für die Phosphoribosyl-AMP bzw. ATP-Pyrophosphatase (katalysiert den zweiten und dritten Schritt des Histidinstoffwechsels) sowie für Histidinol-Dehydrogenase (für den neunten und zehnten Schritt). Auf dem pGREG505 Vektor ist dagegen die Information für das His3 Gen, welches für die Imidazol-Glycerol-Phosphatase-Dehydrogenase codiert und den sechsten Schritt des Stoffwechsels katalysiert. Somit war es nicht möglich über eine Komplementation zu selektieren. Die Kontrolle über den Einbau der cDNA der Carboanhydrase konnte nur physiologisch über die *Stopped Flow* Messung erfolgen. An den Ratenkonstanten, die ein Maß für die Geschwindigkeit der Reaktion sind, wurde sichtbar, dass die Hefe mit pGREG505\_CA einen langsameren Umsatz an Kohlendioxid hatte, als die mit dem zur Verfügung gestellten pYes2/CT\_CA Konstrukt (Abbildung 3-IV).



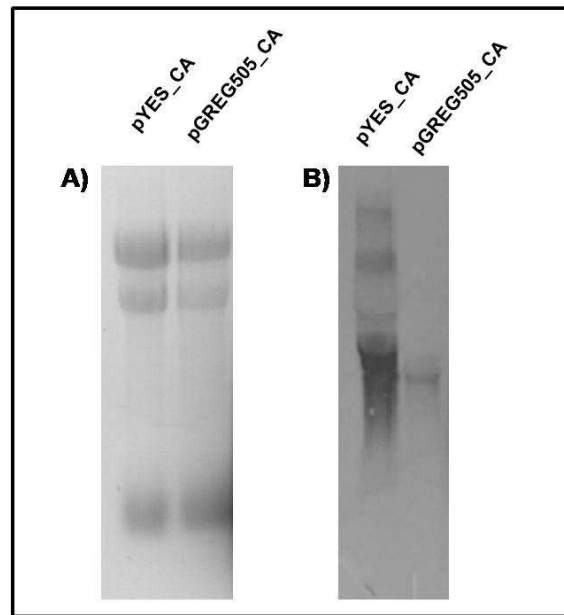
**Abbildung 3-IV: A)** Grafische Darstellung der zeitabhängigen Fluoreszenzabnahme in Folge der pH-Wert Änderung durch CO<sub>2</sub>-Aufnahme von ganzen Hefezellen von *Saccharomyces cerevisiae* (SY1), transformiert mit unterschiedlichen Tabak-Carboanhydrase-Konstrukten. **B)** Vergleich der gemittelten Ratenkonstanten  $k$  [s<sup>-1</sup>] mit Standardfehler der unterschiedlichen Klone, die ein Maß für die Geschwindigkeit der Reaktion darstellt (n=30).

Der Wert für die Ratenkonstante  $k$  [s<sup>-1</sup>] war nur halb so groß. Das war unter anderem darauf zurückzuführen, dass der pGREG Vektor in weniger Kopien vorlag als pYes2/CT\_CA, der zu den *high copy* (in viel Kopien vorkommend; bis zu 500 Kopien in einer Zelle) Plasmiden gehört. Die physiologische Messung ließ keine Aussage darüber zu, ob die CA durch die homologe Rekombination optimal hinter dem GAL1 Promotor integriert wurde. Aus diesem Grund wurden weitere Klone hergestellt. Das HIS-Gen zwischen den Rekombinationsstellen wurde aus dem leeren pGREG505 Vektor mit Restriktionsenzymen entfernt. Anschließend wurde die cDNA der Carboanhydrase über diese Restriktionsschnittstellen in den pGREG505 Vektor eingebracht und das entstandene Plasmid in die SY1-Hefe transformiert. Mit einem der neu entstandenen pGREG505\_CA Klone wurde zunächst eine Induktionskurve über 10 h, 12 h, 14 h und 16 h angefertigt. Die Kinetik des optimalen Induktionszeitpunktes der Hefe mit pGREG505\_CA wurde dann mit den korrespondierenden Ergebnissen einer Hefe, die den pYes2/CT\_CA Vektor trug, verglichen. Auch hier ergab sich eine auffällig langsamere Kinetik (Abbildung 3-V).



**Abbildung 3-V:** **A)** Grafische Darstellung der zeitabhängigen Fluoreszenzabnahme in Folge der pH-Wert Änderung durch CO<sub>2</sub>-Aufnahme nach Induktion (10 h, 12 h, 14 h und 16 h) von Hefezellen transformiert mit pGREG505\_CA im Vergleich mit dem Hefe-Klon pYes2/CT\_CA in *Saccharomyces cerevisiae* SY1. **B)** Induktionsverlauf von pGREG505\_CA anhand der Ratenkonstanten k. **C)** Vergleich der Ratenkonstanten k mit Standardfehler (n= 30) der Induktion von pGREG505\_CA und pYes2/CT\_CA.

Zum besten Induktionszeitpunkt von 14 h ist der k-Wert der Hefe mit pGREG505\_CA nur etwa halb so groß, wie bei Hefe mit pYes2/CT\_CA. Somit war der Unterschied eindeutig darauf zurückzuführen, dass der pGREG Vektor in der Hefe in weniger Kopien vorliegt als der pYes2/CT\_CA Vektor, was sich auch durch Northern-Hybridisierung zeigen lässt (Abbildung 3-VI). Um das Plasmid weiter verwenden zu können, wurde es nachträglich modifiziert.



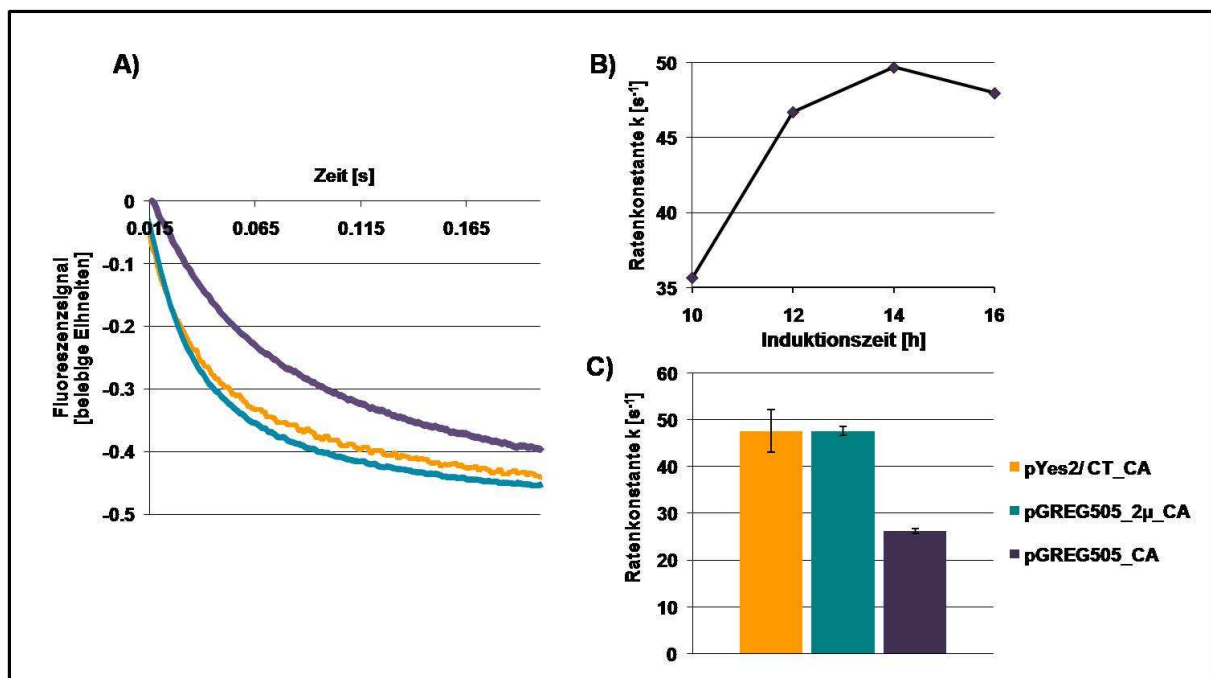
**Abbildung 3-VI: A)** RNA-Gelbild und **B)** Northern Hybridisierung der Expression der Hefezellen transformiert mit den Tabak-Carboanhydrase Vektoren pGREG505\_CA und pYes2/ CT\_CA im Vergleich. Die RNA wurde mit Hilfe eines DIG-Antikörpers gegen die Carboanhydrase auf der Membran detektiert.

### 3.2.2 Modifikation des pGREG505\_CA Plasmids

Um zu vermeiden, dass durch zu wenig Carboanhydrase-Moleküle die Umsatzrate des Kohlendioxids ( $\text{CO}_2$ ) einen begrenzenden Faktor in der späteren *Stopped Flow* spektrophotometrischen Messung darstellt, musste eine hohe Expression sichergestellt werden. Es wurden hierfür zwei Strategien gewählt: In dem vielfach kopierenden Plasmid pYes2/CT mit Carboanhydrase sollte der Uracil Selektions-Marker gegen das Gen für Leucin mittels homologer Rekombination ausgetauscht werden. Parallel dazu wurde mit der gleichen Methode versucht den  $2\mu$ -Replikationsursprung des pYes2/CT Vektors in den wenig kopierenden pGREG505 mit der Carboanhydrase einzubringen. Der Versuch des Austausches des Gens für Uracil gegen das für Leucin führte zu keinen Hefe-Klonen. Die Strategie den  $2\mu$ -Replikationsursprung in pGREG505\_CA einzubauen war dagegen erfolgreich. Die Klone wurden anhand von PCR und mit Hilfe des *Stopped Flow* Spektrophotometers charakterisiert.

### 3.2.3 Untersuchung der CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit des modifizierten pGREG505\_2μ\_CA

Die Messungen der CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit des Konstruktes pGREG505\_2μ\_CA wies einen ähnlichen Kurvenverlauf auf wie die der Hefe mit pYes2/CT\_CA (Abbildung 3-VII). Um eine genauere Vorstellung der Expression zu bekommen wurde eine Induktionskurve angefertigt. Es wurden dabei 10 h, 12 h, 14 h und 16 h als Zeitpunkte gewählt. Es sollte überprüft werden, ob nach Einbau des 2μ-Replikationsursprungs eine ähnliche Induktionsdauer benötigt wird, wie bei Verwendung des unveränderten *low copy* Plasmids. Daneben sollten die Ratenkonstanten der Hefe mit dem Vektor pGREG505\_2μ\_CA zur optimalen Induktionszeit mit denen mit pYes2/CT\_CA sowie dem unveränderten pGREG-Konstrukt verglichen werden.

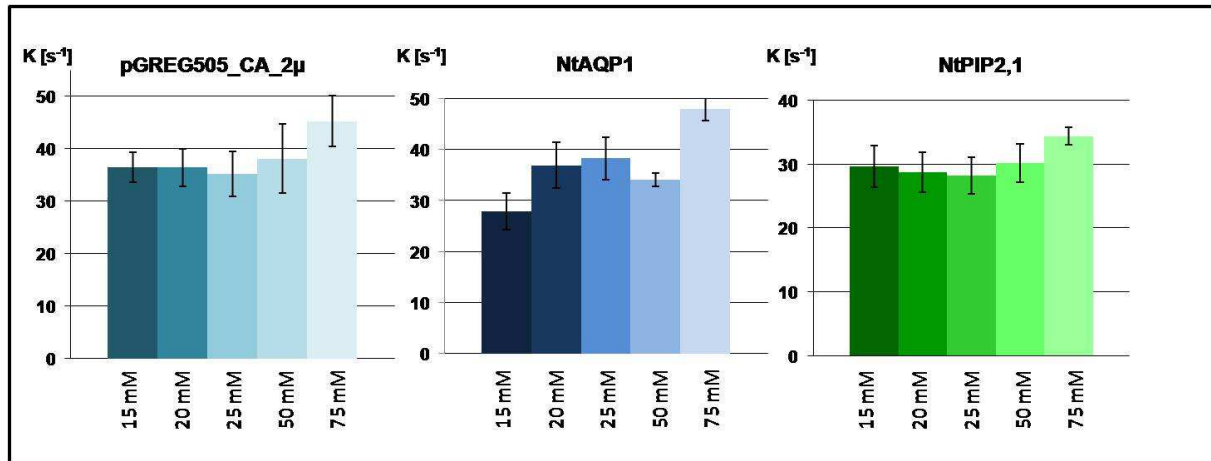


**Abbildung 3-VII:** **A)** Grafische Darstellung der zeitabhängigen Fluoreszenzabnahme in Folge der pH-Wert Änderung durch CO<sub>2</sub>-Aufnahme von Hefezellen transformiert mit den drei unterschiedlichen Carboanhydrase-Konstrukten **B)** Verlauf der Induktion von pGREG505\_2μ\_CA anhand der ermittelten Ratenkonstanten  $k$  [s<sup>-1</sup>] **C)** Vergleich der gemittelten Ratenkonstanten der drei Carboanhydrase-Konstrukte (n=30).

An den Ratenkonstanten wurde sichtbar, dass die höchste Expression der Carboanhydrase in dem modifizierten pGREG505\_2 $\mu$ -Vektor auch bei 14 h liegt (Abbildung 3-VII). Der Vergleich der Werte für die Hefe mit dem veränderten Vektor bzw. mit dem *high copy* Plasmid pYes2/CT\_CA wiesen jetzt ähnlich hohe Ratenkonstanten auf. Die Ratenkonstante hatte sich gegenüber dem unveränderten Vektor annähernd verdoppelt. Mit dem verbesserten pGREG\_2 $\mu$ \_CA Vektor, verschiedenen Aquaporinen und ihren hetero- und homotetrameren Konstrukten wurden dann Doppel-Transformanten hergestellt. Diese wurden in allen folgenden Analysen zur CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit eingesetzt. Die Benennung der Doppel-Transformanten erfolgte, der Einfachheit halber, nach dem transformierten Aquaporinkonstrukt, da die Carboanhydrase bei allen gleich enthalten war.

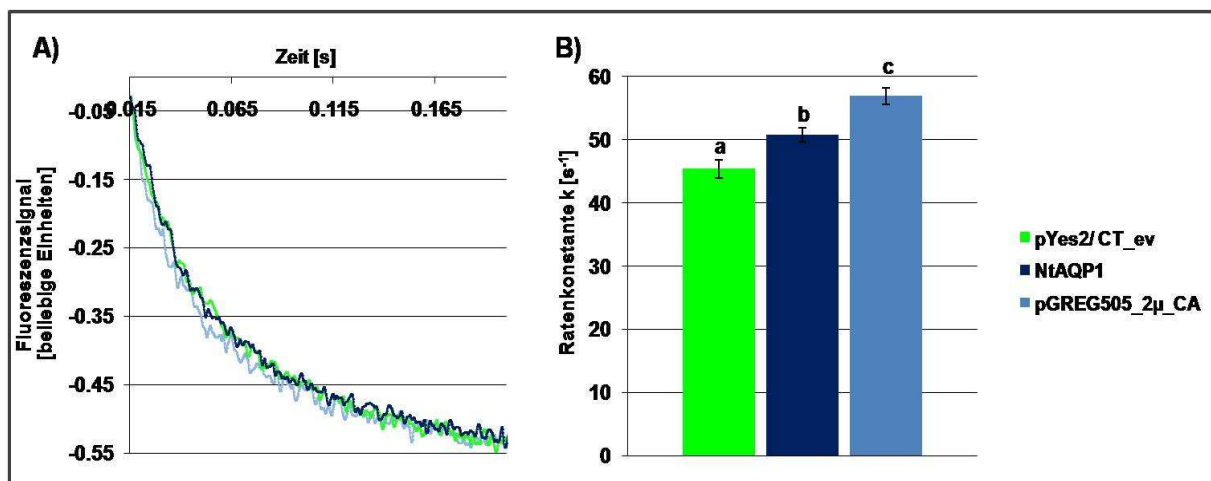
### **3.2.4 Ermittlung der optimalen Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) Konzentration im Mischpuffer**

Neben der Bestimmung des bestmöglichen Induktionszeitpunktes wurde für die Messung mit ganzen Hefezellen auch die geeignete NaHCO<sub>3</sub>-Konzentration für den Mischpuffer anhand einer Testreihe ermittelt. Als Grundlage dienten dafür die Puffer von Prasad *et al* (Prasad, Coury et al. 1998) sowie von Yang *et al.* (Yang, Fukuda et al. 2000). Neben HEPES als Puffersystem wurden 15 mM, 20 mM, 25 mM, 50 mM und 75 mM NaHCO<sub>3</sub> geprüft. Es zeigte sich, dass bei einer Konzentration von 75 mM die besten Ergebnisse erzielt wurden (Abbildung 3-VIII). Daher wurde im Folgenden diese Konzentration für den CO<sub>2</sub>-Mischpuffer verwendet.



**Abbildung 3-VIII:** Testreihe mit verschiedenen Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )-Konzentrationen im  $\text{CO}_2$ -Puffer. Die SY1-Transformanten wurden für 14 h induziert und wie unter 2.7.4 beschrieben angefärbt. Aufgetragen sind die ermittelten Ratenkonstanten  $k$  [ $\text{s}^{-1}$ ] mit Standardfehler. ( $n=10$ )

Bei der Analyse der Hefe mit pGREG505\_2μ\_CA fiel auf, dass dieser Hefeklon eine höhere Ratenkonstante aufwies, als die Doppel-Transformanten. Dies war auch bei Hefezellen die mit Carboanhydrase und dem leeren pYes2/CT\_ev (*empty vector*) transformiert waren der Fall (Abbildung 3-IX).



**Abbildung 3-IX: A)** Grafische Darstellung der zeitabhängigen Fluoreszenzabnahme in Folge der pH-Wert Änderung durch  $\text{CO}_2$ -Aufnahme gemessen mit ganzen Hefezellen, transformiert mit Tabak-Carboanhydrase allein oder in Kombination mit NtAQP1 bzw. pYes2/CT\_ev (*empty vector*). **B)** Vergleich der ermittelten Ratenkonstante  $k$  [ $\text{s}^{-1}$ ] mit Standardfehler der drei Hefeklone ( $n=30$ ). Die Buchstaben geben die statistischen Gruppen an.



Um eine Kontrolle zu erhalten anhand derer man die Messergebnisse aller Doppel-Transformanten einordnen konnte, bedurfte es daher eines Membranproteins welches nachweislich keinerlei Durchlässigkeit für  $\text{CO}_2$  besitzt. Da für Membranproteine bis auf das humane AQP1, dessen Durchlässigkeit kontrovers diskutiert wird, keine weiteren Untersuchungen bekannt sind, konnte die  $\text{CO}_2$ -Leitfähigkeit für andere verwendbare Proteine nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurden noch zwei weitere Aquaporinkonstrukte hergestellt. Diese sollten nur die ersten drei transmembranen Helices enthalten und somit nicht in der Lage sein eine funktionelle Pore zu bilden.

### **3.2.5 Analyse der Enzymaktivität der Tabak-Carboanhydrase mittels Massenspektrometer**

Um eine Vorstellung davon zu erhalten, ob die Carboanhydrase wirklich durch die Expression eines weiteren Proteins beeinträchtigt ist, wurde das Angebot von Prof. Gerolf Gros von der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) angenommen, eine massenspektrometrische Analyse von Lysaten verschiedener Hefetransformanten durchzuführen. Mit diesem Verfahren kann eine genaue Aussage über die Umsatzrate des Enzyms getroffen werden. Im Fall der CA wurde dafür der Austausch von  $^{18}\text{O}$  Sauerstoff zwischen  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{H}_2\text{O}$  durch kontinuierliche Messung des  $\text{C}^{18}\text{O}_2$ -Partialdrucks im Hefe-Lysat massenspektrometrisch beobachtet. Bei Anwesenheit von Carboanhydrase kommt es zu einem charakteristischen zweiphasigen Verlauf des  $\text{C}^{18}\text{O}_2$  Signals (Itada and Forster 1977). Aus diesem lässt sich neben der Aktivität des Enzyms auch auf  $\text{HCO}_3^-$  bzw.  $\text{CO}_2$ -Leitfähigkeit von Zellen rückschließen. Das Verfahren wurde schon erfolgreich für  $\text{CO}_2$ -Leitfähigkeitsmessungen tierischer Gewebe angewandt (Endeward, Musa-Aziz et al. 2006). Die Lysate von drei in dieser Arbeit verwendeter Hefetransformanten wurden von Herrn Dr. Endeward von der MHH mit einem Massenspektrometer analysiert. Es handelte sich dabei um Hefe mit dem Vektor pGREG505\_2 $\mu$ \_CA alleine bzw. zusammen mit denen für NtAQP1 oder

NtPIP2;1. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der Lysate wurden in der folgenden Tabelle 3 mit den korrespondierenden *Stopped Flow* spektrophotometrisch-bestimmten  $P_{CO_2}$ -Werten gegenüber gestellt.

**Tabelle 3:** Auflistung der Messergebnisse der Massenspektrometrischen Untersuchung der Lysate verschiedener Hefetransformanten und der in dieser Arbeit korrespondierend ermittelten  $P_{CO_2}$ -Werte

Name des Konstruktes	Massenspektrometrisch ermittelte CA-Aktivität (MHH)	$P_{CO_2}$ -Wert [cm/s] aus der <i>Stopped Flow</i> Messung
pGREG505_2 $\mu$ _CA	1434 $\pm$ 30	7,07* 10 <sup>-3</sup>
NtAQP1	773 $\pm$ 37	6,31* 10 <sup>-3</sup>
NtPIP2;1	583 $\pm$ 37	4,83* 10 <sup>-3</sup>

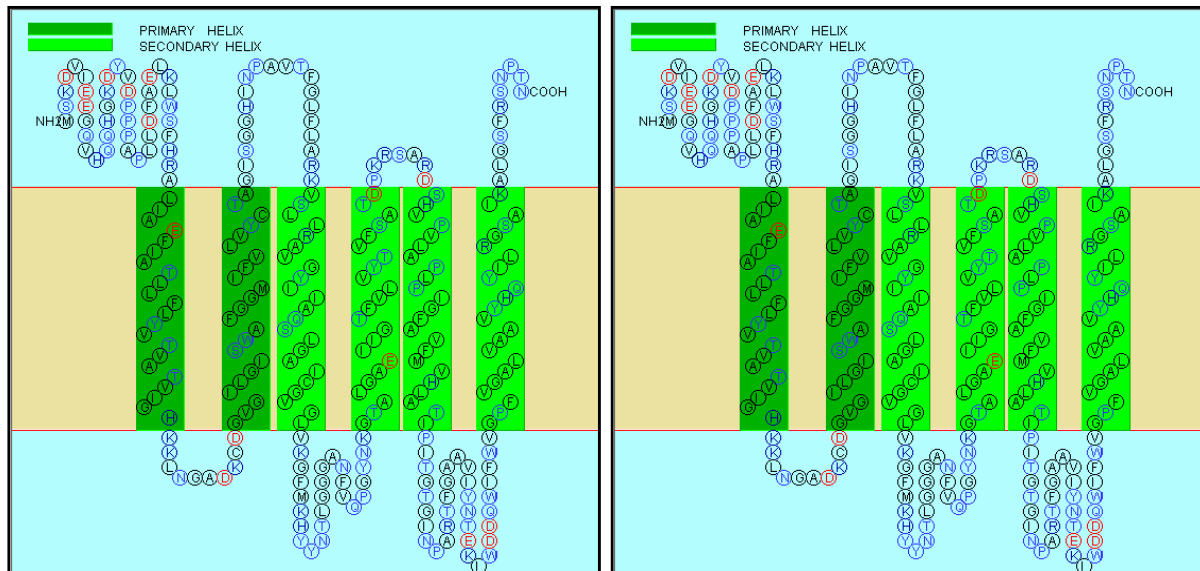
Anhand der massenspektrometrischen Analyse kann man zunächst deutliche Unterschiede in der Aktivität der Carboanhydrase sehen. Hier fällt besonders die gegenüber den Doppeltransformanten um etwa 50 – 60% höhere CA-Aktivität der Hefetransformante mit dem Vektor pGREG505\_2 $\mu$ \_CA alleine auf. Solch ausgeprägte Abstufungen lassen sich in den *Stopped Flow*-Experimenten nicht erkennen. Der Unterschied in den  $P_{CO_2}$ -Werten zwischen der Einzeltransformante mit CA und den Doppeltransformanten ist mit 10 - 20% nur relativ gering.

### 3.3. Herstellung weiterer Aquaporin Konstrukte

#### 3.3.1 Generierung eines 3Helix-Konstruktes von NtPIP2;1 und NtAQP1

Für die fehlende Kontrolle sollte ein Protein verwendet werden, welches nachweislich in die Plasmamembran integriert wird, aber keine Pore ausbildet. Die Wahl fiel auf jeweils die ersten drei transmembranen Helices des wasserleitfähigen NtPIP2;1 und des  $CO_2$ -leitenden NtAQP1. Die Lage der Helices konnte mit Hilfe des Internet-Programmes SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) (Abbildung 3-X) bestimmt und die Aminosäuresequenz in die Nukleotidsequenz übersetzt werden.

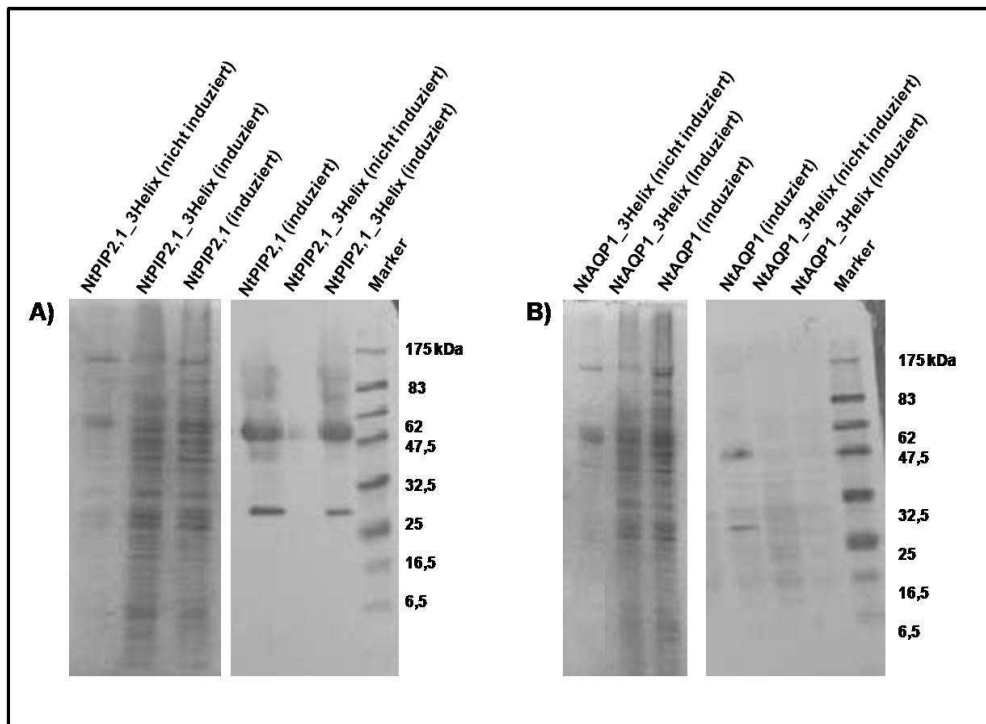
Mit Hilfe von PCR wurden die entsprechenden Fragmente von der cDNA der Aquaporine vervielfältigt und in den pYes2/CT Vektor über Restriktionsschnittstellen eingebracht. Nach Transformation der SY1-Hefe mit diesen Plasmiden wurde die Expression über Western Hybridisierung analysiert.



**Abbildung 3-X:** Bestimmung der Lage der transmembranen Helices von NtAQP1 (links) und NtPIP2;1 (rechts) durch das SOSUI Programm (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>)

### 3.3.2 Analyse der beiden 3Helix-Konstrukte mittels Western Hybridisierung

Nach Anzucht und Induktion der beiden transformierten Hefen mit den 3Helix-Konstrukten wurden die Gesamtproteine isoliert und analysiert. Die Western Hybridisierung der beiden generierten Klone zeigte, dass nur das 3Helix-Konstrukt des NtPIP2;1 exprimiert wurde (Abbildung 3-XI). Die drei Helices mit einer erwarteten Molekularmasse von etwa 15 kDa lagerten sich dabei zu Monomeren (Bande bei 38 kDa) und Dimeren (60 kDa) zusammen. Damit entstand das gleiche Bild wie bei dem vollständigen NtPIP2;1, welches als Positivkontrolle für die Funktion des Antikörpers diente. Da das 3Helix-Konstrukt des NtAQP1 kein Signal aufwies, wurde im Weiteren nur die transformierte Hefe mit NtPIP2;1\_3Helix und Tabak-Carboanhydrase für die folgenden Messungen als Kontrolle verwendet.



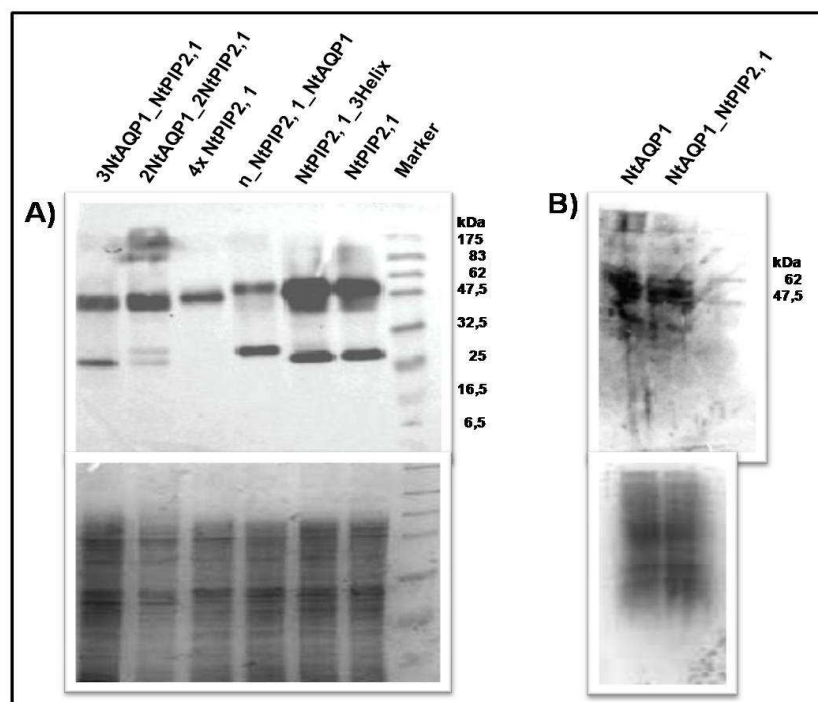
**Abbildung 3-XI:** Western Hybridisierung der Membranproteine der beiden 3-Helix-Konstrukte aus *Saccharomyces cerevisiae* SY1 **A)** Die NtPIP2;1 Proteinpräparationen wurden mit einem spezifischen NtPIP2;1 Antikörper hybridisiert. Als Kontrollen diente die Präparation von Proteinen des nativen NtPIP2;1 und die des uninduzierten NtPIP2;1\_3Helix-Konstruktes. **B)** NtAQP1 Proteinpräparationen, die mit einem spezifischen NtAQP1 Antikörper detektiert wurden.

### 3.3.3 Herstellung eines Homotetramers aus vier NtAQP1 Aquaporinen

Neben dem zur Verfügung gestellten künstlichen Homotetramer des hoch wasserleitfähigen NtPIP2;1, sollte für die Messung der CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit noch das entsprechende Konstrukt für NtAQP1 generiert werden. Dazu wurde das ebenfalls zur Verfügung gestellte Heterotetramer aus drei aneinander geknüpften cDNA von NtAQP1 und einer von NtPIP2;1 verwendet. Über Restriktionsschnittstellen wurde ein Austausch des NtPIP2;1 vorgenommen. Das erhaltene Konstrukt wurde mit Restriktionsenzymen charakterisiert. Die Transformation der SY1-Hefe scheiterte jedoch. Sowohl mit der Hitzeschock- als auch mit der biolistischen Transformations-Methode wurden keine Klone erhalten. So konnte das generierte Homotetramer in dieser Arbeit nicht auf eine eventuell erhöhte CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit untersucht werden.

### 3.3.4 Nachweis aller verwendeten Proteinkonstrukte in der Hefe-Plasmamembran

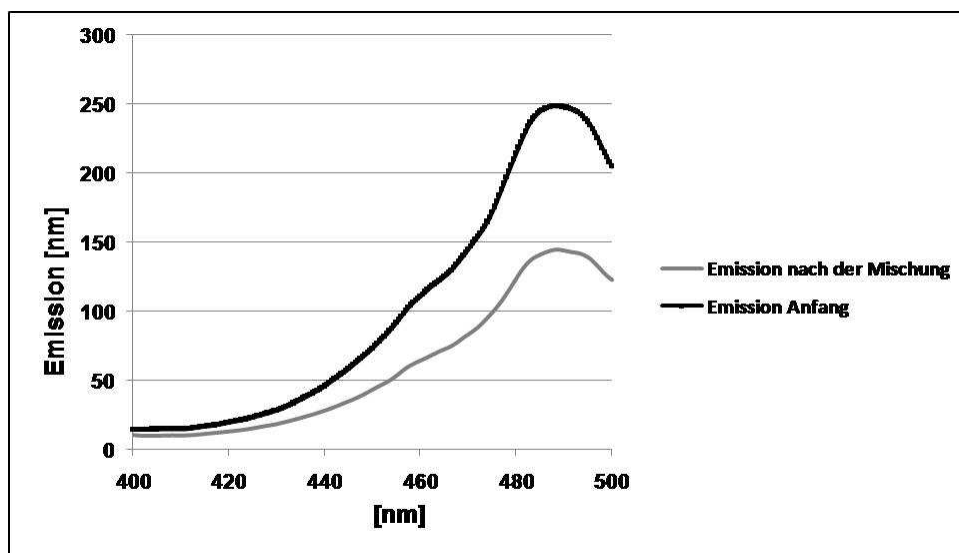
Nachdem die Expression der 3Helix-Konstrukte und der verschiedenen Heterotetramere (Arbeit von Matthias Fischer) schon durch Western-Hybridisierung nachgewiesen wurde, sollte der Einbau in die Hefe-Plasmamembran überprüft werden. Dazu wurden die Membranen aus der induzierten Hefe isoliert und 5 mg/ml Protein auf ein SDS-Gel aufgetragen. Dieses zeigte keine Unterschiede im Muster und Konzentration der Proteine. In der anschließenden Western Hybridisierung konnte nachgewiesen werden, dass alle Konstrukte in die Plasmamembran integriert werden (Abbildung 3-XII). Vor allem für NtPIP2;1 und sein 3Helix-Konstrukt konnte ein starkes Signal detektiert werden. Die anderen Homo- und Heterotetramere waren dagegen etwas schwächer zu sehen.



**Abbildung 3-XII:** **A)** Protein SDS-Gel und Western Hybridisierung der Plasmamembranpräparation von SY1-Hefe transformiert mit unterschiedlichen Aquaporinkonstrukten, detektiert mit einem NtPIP2;1 spezifischen Antikörper. **B)** Gel und Hybridisierung zweier Plasmamembranpräparationen aus SY1-Hefe mit Aquaporin-Konstrukten, die mit dem spezifischen NtAQP1 Antikörper detektiert wurden.

### 3.3.5 Bestimmung des finalen internen Zell-pH mit einem Fluoreszenzspektrometer

Um den Permeabilitätskoeffizienten  $P_{\text{CO}_2}$  für die einzelnen Aquaporinkonstrukte zu berechnen, musste der finale intrazelluläre pH-Wert der Hefezelle ermittelt werden. Dazu wurde nach der Methode von Slavik *et al.* (Slavik 1982) verfahren. Die Hefezellen mit dem NtPIP2;1\_3Helix-Konstrukt und Carboanhydrase wurden wie für eine Messung in Induktionsmedium angezogen (siehe 2.4.3) und angefärbt (siehe 2.7.4). In einem Fluoreszenzspektrometer wurde dann das Emissionsspektrum des Farbstoffes der beladenen Zellen im Anfangszustand und nach der Mischung mit  $\text{NaHCO}_3$ -Puffer aufgenommen (Abbildung 3-XIII). Das errechnete Verhältnis der Emission von 490 nm zu 435 nm konnte dann anhand der Gleichung einer schon vorhandenen Eichkurve des Fluoresceins (siehe 2.6.2) bestimmt und der intrazelluläre pH Wert am Anfang und Ende ermittelt werden. Die Messungen ergaben, dass sich die Zellen dem Umgebungs-pH des Puffers (pH 6) anpassten (Slavik 1983) (Tabelle 4). Für die Berechnungen des Permeabilitätskoeffizienten  $P_{\text{CO}_2}$  wurde im Weiteren der Mittelwert des finalen pH (6,27) verwendet.



**Abbildung 3-XIII:** Beispiel eines Fluoreszenzspektrums von Fluoresceinbisacetat angefärbten Hefezellen vor - und nach der Mischung mit  $\text{NaHCO}_3$ -Puffer ( $n=3$ ). Durch Änderung des internen Zell-pH wird die Emission der Fluoreszenz deutlich vermindert.

**Tabelle 4:** Auflistung der anhand einer Eichgerade ermittelten pH-Werte vor- und nach der Mischung mit NaHCO<sub>3</sub>-Puffer.

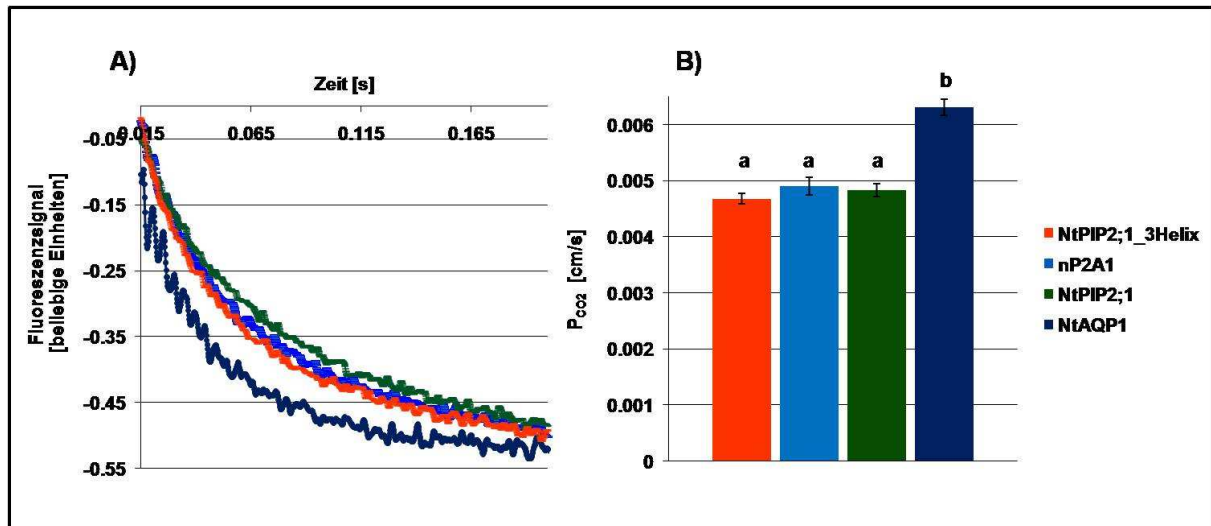
pH Anfang	finaler pH	ΔpH
6.23	6.04	0.192
6.10	5.98	0.120
6.90	6.80	0.100
6.50	6.26	0.238
<b>Mittelwert</b>		
6.43	6.27	0.163

### 3.4 Analyse der CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit pflanzlicher Aquaporine mit ganzen Hefezellen

#### 3.4.1 Analyse von n\_NtPIP2;1\_NtAQP1 (n\_P2A1)

Das Aquaporin-Konstrukt n\_P2A1 besteht aus einem NtAQP1 bei welchem der N-Terminus durch den kürzeren N-Terminus des wasserleitenden NtPIP2;1 ausgetauscht wurde. In der Arbeit von Matthias Fischer wurde dieses Konstrukt bereits auf die Beteiligung des N-Terminus am Mechanismus der Wasserleitfähigkeit hin untersucht. In der vorliegenden Arbeit sollte nun analysiert werden, ob der N-Terminus auch Auswirkungen auf die Kohlendioxidleitfähigkeit des NtAQP1 hat. Dazu wurden *Stopped Flow* spektrophotometrische Messungen der doppelt transformierten Hefen mit diesem Konstrukt, dem unveränderten NtAQP1 und NtPIP2;1 als Vergleich sowie dem NtPIP2;1\_3Helix als Kontrolle durchgeführt. Mittels des BIOKINE-Programmes (BioLogic) wurden anschließend die verschiedenen Ratenkonstanten  $k$  ermittelt (Abbildung 3-XIV) und die Werte für den Permeabilitätskoeffizienten für Kohlendioxid  $P_{\text{CO}_2}$  berechnet. Die Auswertung ergab, dass die CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit tatsächlich mit dem Austausch des N-Terminus abnimmt. Es ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied vom nativen NtAQP1 ( $P_{\text{CO}_2} = 6,31 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ ) zum veränderten n\_P2A1 ( $P_{\text{CO}_2} = 4,90 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ ; Signifikanz > 0,05 ANOVA). Der ermittelte Wert des Konstruktes liegt auf dem Niveau des unmodifizierten NtPIP2;1 ( $P_{\text{CO}_2} = 4,83 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ )

wie auch der Kontrolle NtPIP2;1\_3Helix ( $P_{\text{CO}_2} = 4,68 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ ). Eine tabellarische Aufstellung der Werte wird im Anhang (Tabelle A-I) angegeben.



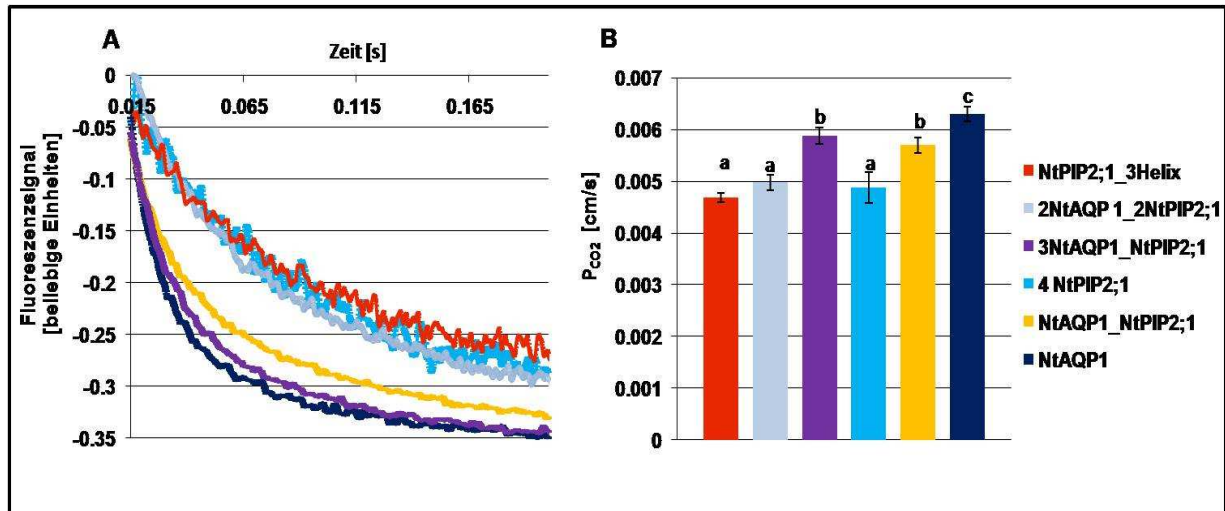
**Abbildung 3-XIV: A)** Grafische Darstellung der zeitabhängigen Fluoreszenzabnahme in Folge der pH-Wert Änderung durch  $\text{CO}_2$ -Aufnahme von Hefezellen mit dem Vektor nP2A1 und den nativen Aquaporinen sowie dem NtPIP2;1\_3Helix Konstrukt als Kontrolle. **B)** Vergleich der berechneten  $P_{\text{CO}_2}$ -Werte mit Standardfehler der unterschiedlichen Hefezellen. Die Buchstaben geben die Zugehörigkeit zu statistischen Gruppen an. (n= 100)

### 3.4.2 Analyse der $\text{CO}_2$ -Leitfähigkeit der Homo- und Heterotetramere von NtAQP1 und NtPIP 2;1

Untersuchungen zur Co-Expression von PIP1 und PIP2 Aquaporinen aus Mais zeigten, dass die Wasserleitfähigkeit der Plasmamembran gegenüber einzeln exprimierten Aquaporin-Isoformen im Versuch mit *Xenopus laevis* Oozyten erhöht ist (Fetter, Van Wilder et al. 2004). Der Einfluss unterschiedlicher Verhältnisse des NtAQP1 und NtPIP2;1 in Heterotetrameren und einem künstlichen Homotetramer von NtPIP2;1 auf die Wasserleitfähigkeit wurde daraufhin durch Matthias Fischer in seiner Arbeit untersucht (Konstrukte siehe Anhang). Es sollte nun geklärt werden, ob sich für die Leitfähigkeit von Kohlendioxid ebenfalls ein Einfluss der Verhältnisse auswirkt und ob sich die Ergebnisse eventuell gegengleich zur Wasserleitfähigkeit darstellen.



Dazu wurden die Hefezellen mit den Vektoren der genannten Konstrukte sowie einem Vektor mit einem Fusionsprotein aus 1x NtAQP1 und 1X NtPIP2;1 unter optimalen Bedingungen angezogen, angefärbt und die Änderung der Fluoreszenz mit Hilfe des *Stopped flow* Spektrophotometers detektiert. Die Ratenkonstante  $k$  wurde bestimmt und der  $P_{CO_2}$ -Wert errechnet (Abbildung 3-XV). Es zeigte sich, dass sowohl das Homotetramer aus 4x NtPIP2;1 ( $P_{CO_2} = 4,87 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ ) wie auch das Heterotetramer mit dem Verhältnis 2x NtAQP1 2x NtPIP2;1 ( $P_{CO_2} = 4,98 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ ) eine Leitfähigkeit wie die Kontrolle (NtPIP2;1\_3Helix;  $P_{CO_2} = 4,68 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ ) haben. Sie bilden somit eine statistische Gruppe. Die beiden Konstrukte mit dem Fusionsprotein 1x NtAQP1 1x NtPIP2;1 ( $P_{CO_2} = 5,70 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ ) und 3x NtAQP1 1x NtPIP2;1 ( $P_{CO_2} = 5,87 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ ) wiesen dazu eine signifikant höhere Leitfähigkeit für Kohlendioxid auf. Die größte Leitfähigkeit hatte aber das native NtAQP1 ( $P_{CO_2} = 6,31 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ ). Allerdings sind die Abstufungen nicht so eindeutig sichtbar, wie im Fall der Wasserleitfähigkeit. Die Kombination eines wasserleitfähigen NtPIP2;1 mit 3x NtAQP1 senkt die Leitfähigkeit um etwa 9%, verglichen mit dem unveränderten NtAQP1. Das Fusionsprotein zeigt einen Abfall um 13% an, beim Verhältnis 2x NtAQP1 zu 2x NtPIP2;1 sind es 28% und das Homotetramer hat eine um 34% geringere Leitfähigkeit für  $CO_2$ . Somit ist eine gewisse Gegenläufigkeit zu den Ergebnissen der  $H_2O$ -Leitfähigkeit zu sehen. Je mehr NtAQP1 vorhanden ist, desto geringer war die Leitfähigkeit für Wasser aber desto höher ist die Durchlässigkeit für  $CO_2$ . Die ermittelten Werte sind nochmal in Tabelle A-II im Anhang aufgelistet.

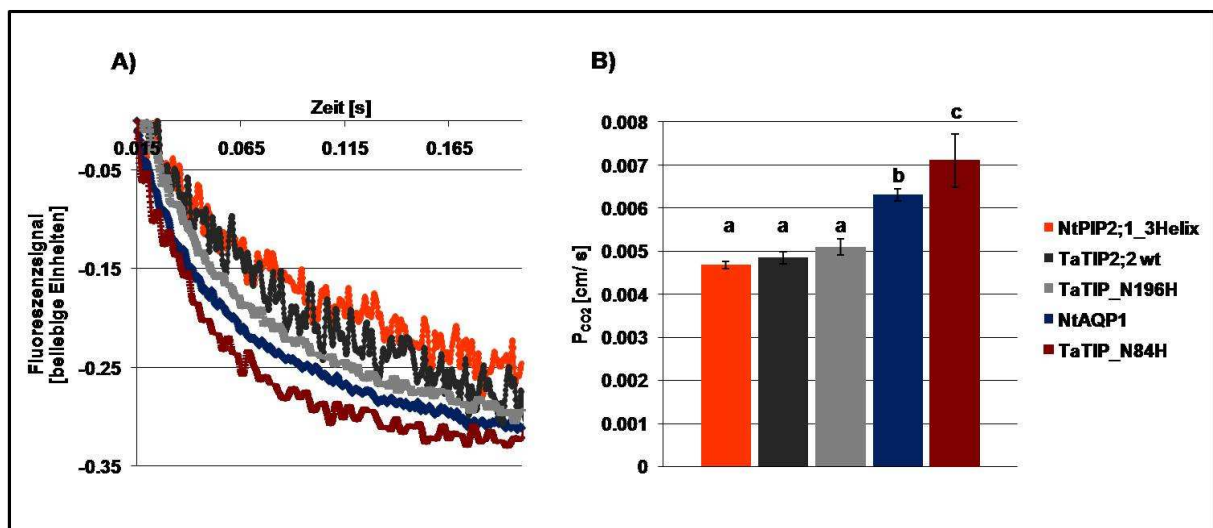


**Abbildung 3-XV: A)** Grafische Darstellung der zeitabhängigen Fluoreszenzabnahme in Folge der pH-Wert Änderung durch  $CO_2$ -Aufnahme verschiedener Hefezellen, transformiert mit Homo- und Heterotetrameren der Aquaporine NtAQP1 und NtPIP2;1 **B)** Vergleich der ermittelten Permeabilitätskoeffizienten  $P_{CO_2}$  mit Standardfehler für Hefezellen mit unterschiedlichen Konstrukten (n= 120).

### 3.4.3 Untersuchung eines weiteren Aquaporins und seiner Mutanten auf $CO_2$ -Leitfähigkeit

Neben der Charakterisierung des nun schon als wasserleitfähig beschriebenen NtPIP2;1 und des  $CO_2$ -permeablen NtAQP1 ist es interessant Aquaporine denen schon andere Leitfähigkeiten nachgewiesen wurden auf ihre Gasdurchlässigkeit hin zu untersuchen. Gewählt wurde hier das TaTIP2;2 aus Weizen (*Triticum aestivum*). Diesem wurde in anderen Arbeiten (Bertl *et al.* 2007; Ayaz M., unveröffentlicht) eine hohe Leitfähigkeit für das Gas Ammoniak ( $NH_3$ ) nachgewiesen. Hiermit stellte sich die Frage, ob dieses Aquaporin auch eine Leitfähigkeit für andere Gase zeigt. Darüber hinaus war es interessant zu analysieren, ob durch gezielte Mutationen an Position 84 und 196 der Aminosäuresequenz dieses Aquaporin seine Leitfähigkeit verändert. Diese Stellen liegen beide in den NPA-Motiven des Aquaporins und wurden in einer anderen Arbeit am HsAQP1 als Schlüsselstellen für die Spezifität bezeichnet (Kong und Ma 2001). Beide Mutanten wiesen keine Funktionalität für  $NH_3$ -Leitfähigkeit auf (Ayaz M., unveröffentlicht). Es sollte getestet werden, ob dies für  $CO_2$  auch der Fall

war. Die Plasmide mit dem unmodifizierten TaTIP2;2 sowie den beiden Konstrukten mit Mutationen an Stelle 84 (TaTIP N84H) und 196 (TaTIP N196H; jeweils Asparagin zu Histidin getauscht) wurden zur Verfügung gestellt. Mit ihnen wurden ebenfalls Hefe-Doppeltransformanten mit Carboanhydrase generiert. Die Anzuchtbedingungen und Vorbereitungen für die Analyse entsprachen denen der Tabak-Aquaporine. Nach der Messung mit dem *Stopped Flow* Spektrophotometer wurde die Ratenkonstante  $k$  und der Permeabilitätskoeffizient  $P_{\text{CO}_2}$  wie zuvor bestimmt. Sowohl das native TaTIP2;2 ( $P_{\text{CO}_2} = 4,85 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ ) wie auch die Mutante TaTIP N196H ( $P_{\text{CO}_2} = 5,09 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ ) wiesen dabei kaum eine Leitfähigkeit für  $\text{CO}_2$  auf. Beide  $P_{\text{CO}_2}$ -Werte lagen im gleichen Bereich wie die der Kontrolle (NtPIP2;1\_3Helix). Dagegen lies die zweite Mutante TaTIP N84H ( $P_{\text{CO}_2} = 7,10 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ ) eine signifikant höhere Leitfähigkeit als beim NtAQP1 ( $< 0,05$  ANOVA), welches hier als Beispiel für ein  $\text{CO}_2$ -permeables Aquaporin diente, erkennen (Abbildung 3-XVI). Eine Auflistung der Werte findet sich in Tabelle A-III im Anhang.

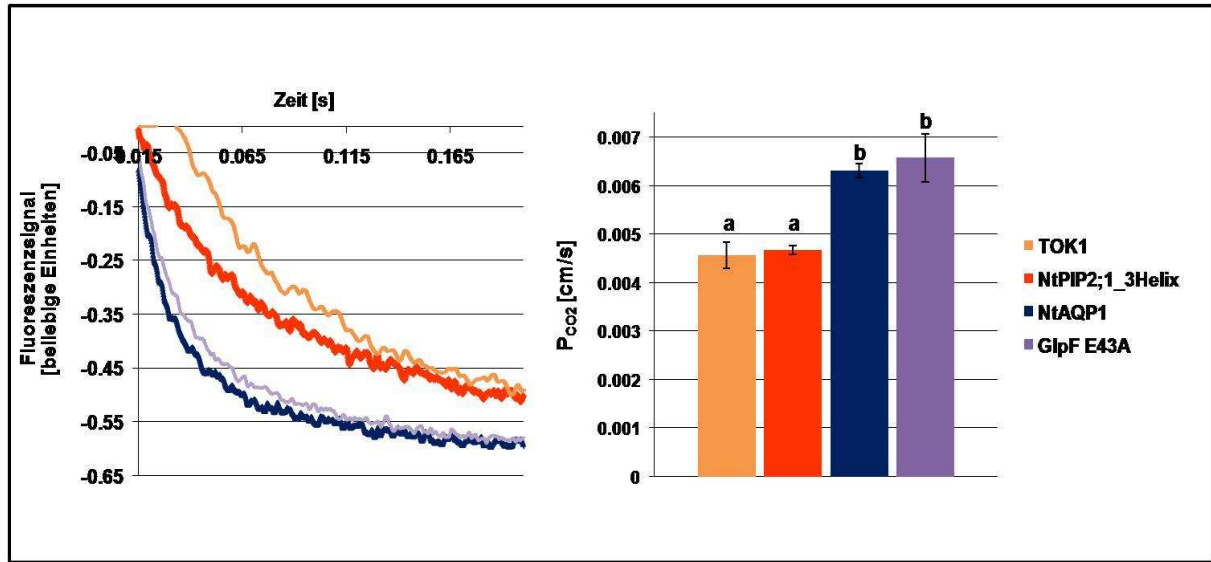


**Abbildung 3-XVI: A)** Grafische Darstellung der zeitabhängigen Fluoreszenzabnahme in Folge der pH-Wert Änderung durch  $\text{CO}_2$ -Aufnahme ganzer Hefezellen mit unterschiedlichen Aquaporin-Konstrukten **B)** Gegenüberstellung der Werte der Permeabilitätskoeffizienten  $P_{\text{CO}_2}$  mit Standardfehler ( $n=30$ ). Die Buchstaben bezeichnen die statistischen Gruppen.

#### 3.4.4 Analyse des GlpF aus *E. coli* und eines Kaliumkanals (TOK1) aus *S. cerevisiae* auf CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit

Neben den pflanzlichen Aquaporinen sollte das Hefe System auch mit Membranproteinen anderer Spezies getestet werden, um auch deren Leitfähigkeit für CO<sub>2</sub> zu untersuchen. Gewählt wurde der aus *E. coli* stammende Glycerinkanal GlpF und der auswärts gleichrichtende Kaliumkanal TOK1 aus *S. cerevisiae*. Das Bakterienprotein ist von seiner Struktur dem menschlichen HsAQP1 sehr ähnlich (Froger, Rolland et al. 2001). Es verfügt ebenfalls über Monomere aus sechs transmembranen Helices, die über etwas längere Schleifen miteinander verbunden sind. Auch NPA-Motive sind vorhanden. Kristallografische Aufnahmen haben gezeigt, dass sich die Monomere zu Tetrameren zusammenlagern (Braun, Philippsen et al. 2000). Bisher ist bekannt, dass GlpF neben einer hohen Leitfähigkeit für Glycerin auch für andere Polyole und Harnstoffderivate durchlässig ist (Maurel, Reizer et al. 1994). Für die vorliegende Arbeit wurde die cDNA für ein GlpF zur Verfügung gestellt, welches nur als Monomer in einer Western-Hybridisierung nachzuweisen war (GlpF E43A, persönliche Mitteilung F. Cymer, Uni Freiburg). Es sollte nun geklärt werden, ob auch dieses Monomer als funktionelle Einheit eine Leitfähigkeit für CO<sub>2</sub> besitzt. Dazu wurde die cDNA mittels Restriktionsenzymen in den Hefeexpressionsvektor pYes2/CT eingebracht. Mit dem entstandenen Vektor wurde eine SY1-Doppeltransformante mit der Tabak-Carboanhydrase hergestellt. Das zweite Protein, welches untersucht wurde war der auswärts gleichrichtende Kaliumkanal TOK1 aus Hefe. Dieser besteht aus einem Tandem von Poren (Ketchum, Joiner et al. 1995), wobei jede einzelne aus acht transmembranen Helices aufgebaut ist. Da das Kalium-Ion mit seiner Hydrathülle größer ist als das Molekül CO<sub>2</sub> könnte das Kanalprotein neben dem spezifischen Substrat auch für das Gas durchlässig sein. Dies sollte durch die Analyse geklärt werden. TOK1 wurde in einem Hefeexpressionsvektor zur Verfügung gestellt und zusammen mit Carboanhydrase in SY1 transformiert. Die Anzucht der beiden generierten Doppeltransformanten erfolgte wie zuvor mit 14 h Induktionszeit.

Nach anfärben der Hefezellen wurden sie mit Hilfe des *Stopped Flow* Spektrophotometers analysiert. Auch die Auswertung wurde wie bei den Aquaporinen gehandhabt. Zunächst wurde die Ratenkonstante  $k$  aller Kurvenverläufe ermittelt und dann der Permeabilitätskoeffizient  $P_{\text{CO}_2}$  errechnet (Abbildung 3-XVII).



**Abbildung 3-XVII: A)** Grafische Darstellung der zeitabhängigen Fluoreszenzabnahme in Folge der pH-Wert Änderung durch CO<sub>2</sub>-Aufnahme von Hefe-Doppeltransformaten. **B)** Vergleich des ermittelten CO<sub>2</sub> Permeabilitätskoeffizienten  $P_{\text{CO}_2}$  mit Standardfehler der Konstrukte (n=30).

Es zeigte sich, dass der auswärts gleichrichtende Kaliumkanal TOK1 ( $P_{\text{CO}_2} = 4,56 \cdot 10^{-3}$  cm/s) kaum eine Durchlässigkeit für Kohlendioxid besitzt. Der ermittelte Wert liegt auf der Höhe der Kontrolle NtPIP2;1\_3Helix ( $4,68 \cdot 10^{-3}$  cm/s) und bildet mit ihm eine statistische Gruppe. Dagegen ist der Wert für das Monomer GlpF E43A ( $6,57 \cdot 10^{-3}$  cm/s) so hoch wie für das NtAQP1 ( $6,31 \cdot 10^{-3}$  cm/s), welches als Beispiel für ein CO<sub>2</sub>-permeables Aquaporin fungierte. (Tabelle A-IV im Anhang)

## 4. Diskussion

### 4.1. Analyse sekretorischen Hefevesikeln

In der vorliegenden Arbeit wurde der SY1-Hefestamm zunächst verwendet, um die physiologischen Eigenschaften pflanzlicher Aquaporine in sekretorischen Hefevesikeln zu studieren. Dieses System ist für Analysen von Membranproteinen generell schon gut etabliert (Walworth and Novick 1987; Nakamoto, Rao et al. 1991) auch physiologische Messungen der H<sub>2</sub>O-Leitfähigkeit mit dem *Stopped Flow* Spektrophotometer brachten gute Ergebnisse (Coury, Mathai et al. 1998; Suga and Maeshima 2004; Soveral, Madeira et al. 2007). Für Messungen der CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit pflanzlicher Aquaporine ist die Versuchsanordnung wie sich zeigte in dieser Form nicht anwendbar. Dies kann in der Methode selbst begründet sein. Bei Analyse der H<sub>2</sub>O-Leitfähigkeit ist die Abnahme der Fluoreszenz-Intensität durch den Löschungs-Effekt (engl. quench-effect) des Fluoreszenzfarbstoffes aufgrund der Volumenänderung der Vesikel für die Detektion maßgebend. Für CO<sub>2</sub>-Untersuchungen ist jedoch zusätzlich das Enzym Carboanhydrase notwendig. Die Detektion des Gases kann nur indirekt über eine Änderung des pH-Wertes erfolgen. Da es sich bei Vesikeln um sehr kleine Kompartimente handelt ist es möglich, dass sich die Veränderung der Emission des Fluoreszenzfarbstoffes durch pH-Wert Änderung im Gegensatz zum Löschungs-Effekt bei einer Volumenänderung nicht so deutlich zeigt. Dies würde die geringe Amplitude bei der Messung erklären. Daneben ist nicht bekannt, in welcher Orientierung die Aquaporine in die Vesikelmembran eingebettet werden und ob durch das Homogenisieren bei der Aufreinigung vielleicht eine Veränderung der Membranorientierung stattfindet. Es stellt sich die Frage, ob Aquaporine in beide Richtungen für Gas passierbar sind oder ob die richtige Orientierung zwingend notwendig ist. Die Ausrichtung der Aquaporine könnte mit proteinbiochemischen Methoden geklärt werden (Palmgren, Askerlund et al. 1990). Auch ist nicht erwiesen, dass Membranproteine in den sekretorischen Vesikeln

funktional vorliegen. Eine für die Funktion wichtige Modifikation wie z.B. Glycosilierung oder Phosphorylierung könnte durch den Organismus erst am Bestimmungsort vorgenommen werden.

#### **4.2. Messungen mit ganzen Hefezellen**

Einige der angeführten Gründe gegen eine Verwendung der sekretorischen Vesikel können bei Messungen mit ganzen Hefezellen vermieden werden. So ist die Zelle mit etwa 5µm doppelt so groß. Sollte die Ausprägung der Fluoreszenz-Intensität Volumen abhängig sein, könnte das durch die Nutzung der ganzen Zelle verbessert werden. Daneben ist davon auszugehen, dass die Aquaporine im Hinblick auf ihre Struktur vollständig und in richtiger Orientierung in die Membranen integriert werden. Hier könnten nur noch speziesspezifische Modifikationen Einfluss haben. Wichtig für das Messprinzip war es einen Überschuss an Carboanhydrase (CA) sicherzustellen. Der Geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist damit nicht die enzymatische Umsetzung des Gases in Kohlensäure und die mit deren Dissoziation verbundene pH-Wert Änderung, sondern der Transport des CO<sub>2</sub> durch das Aquaporin. Die Anwesenheit des Enzyms Carboanhydrase wird durch das Einbringen eines Vektors gewährleistet. Der im Arbeitskreis vorhandene, zunächst verwendete, wenig kopierende Vektor pGREG505 (Euroscarf) war dafür nicht geeignet, da aufgrund zu weniger Kopien des Vektors in der Zelle auch zu geringe Mengen an CA gebildet wurden. Die Ratenkonstante dieser Hefezellen zeigte einen deutlich niedrigeren CO<sub>2</sub>-Umsatz als die mit dem viel kopierenden pYes2/CT Vektor transformierten. Um den Vektor trotzdem weiterverwenden zu können, wurde der pGREG505 Vektor verändert. Nach der Modifikation des Plasmids mit dem 2µ-Replikationsursprung konnte eine Verdopplung der Ratenkonstante erreicht werden. Eine Vergleichsmessung von transformierten Hefen mit dem pGREG505\_2µ\_CA Vektor alleine bzw. Doppeltransformanten von diesem mit einem leeren Vektor oder einem Aquaporin zeigten jedoch unerwartete Werte. Die Ratenkonstanten wiesen untereinander einen signifikanten Unterschied auf. Somit ist die Bildung der CA durch die Produktion eines

weiteren Proteins eventuell beeinträchtigt. Eine Konkurrenz bei der Expression ist nicht auszuschließen. Dies erklärt jedoch nicht die Diskrepanz bei Anwesenheit eines leeren Vektors, der kein weiteres Protein exprimiert. Aus den massenspektrometrischen Messungen der Hefelysate kann man ableiten, dass die Aktivität der CA tatsächlich beeinträchtigt ist, aber auch in den Doppeltransformanten die Carboanhydrase im Überschuss vorliegen muss. Die Differenzen der CA-Aktivitäten wirken sich anscheinend auf die Stopped Flow-Experimente nicht so stark aus, wie von den Werten zu erwarten wäre. Um einen Effekt gänzlich auszuschließen, sollte eine einheitliche CA-Expressionsrate in allen Hefetransformanten das Ziel sein. Dies könnte vielleicht durch Integration der cDNA der Carboanhydrase in das Hefegenom erreicht werden.

Die klassische Sicht, dass Gase leicht durch den Lipidanteil von Zellmembranen diffundieren ist in den letzten Jahren durch verschieden Befunde in Frage gestellt worden. So konnte gezeigt werden, dass einige Zellmembranen impermeabel für CO<sub>2</sub> und NH<sub>3</sub> sind, während andere eine gute Durchlässigkeit besitzen (Kikeri, Sun et al. 1989; Burckhardt and Fromter 1992; Singh, Binder et al. 1995). Die Gruppe um Mark Zeidel konnte nachweisen, dass die Leitfähigkeit künstlicher Membranen je nach Fluidität und Lipidzusammensetzung besonders für NH<sub>3</sub> sehr variiert (Hill, Rivers et al. 1999). Für CO<sub>2</sub> scheint die Durchlässigkeit jedoch nicht von der Fluidität abzuhängen (Hill, Rivers et al. 1999). Gutknecht *et al.* (1977) ermittelte bei Untersuchungen an Lipiddoppelschichten eine CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit von 0,35 cm/s. Dieser Wert wird von Erythrozytenmembranen um ein zehn Faches überschritten (2cm/s) (Forster, Gros et al. 1998). Somit kann die Zusammensetzung biologischer Membranen durchaus von Bedeutung sein (Engelman 2005). Sollten sie eine Impermeabilität für Gase aufweisen, kann ein Gasaustausch nur durch die Anwesenheit spezieller Membranproteine erfolgen. Im Colon und Magen z.B. können sehr hohe CO<sub>2</sub> Partialdrücke auftreten, die in dem angrenzenden Epithel zu einer intrazellulären Acidose führen können. Somit ist es physiologisch durchaus sinnvoll, wenn die apikalen Membranen hier impermeabel für CO<sub>2</sub> sind. Dennoch muss aber ein



Gasaustausch auch in diesem System z.B. durch Membranproteine möglich sein. Ob es sich bei diesen Proteinen um Aquaporine handelt, wird dabei kontrovers diskutiert. Nicht nur bei Tieren spielt der  $\text{CO}_2$  Gaswechsel eine wichtige Rolle, sondern auch bei Pflanzen. Da das Schlüsselenzym Rubisco eine geringe Affinität zu seinem Substrat hat lässt sich eine hohe Austauschrate nur durch einen geringen Diffusionswiderstand in der Pflanze erreichen (von Caemmerer, Lawson et al. 2004). Eine Veränderung des Membrantransportes von  $\text{CO}_2$  hat demnach direkte Auswirkungen auf angeschlossene Prozesse. Die Verfügbarkeit von  $\text{CO}_2$  steuert das Öffnen und Schließen des Spaltöffnungsapparates und damit die Photosynthese. Eine Aufklärung des zellulären Vorganges des Gastransportes hat demnach eine große Bedeutung für das Verständnis von Abläufen in der Pflanze. Bisher wurden Erkenntnisse mit physiologischen Messmethoden gewonnen. So konnte in Tabakpflanzen, die erniedrigte oder erhöhte NtAQP1 Expression aufwiesen durchaus ein Einfluss sowohl auf den Wassertransport als auch auf den  $\text{CO}_2$  abhängigen Prozess der Photosynthese ermittelt werden (Siefritz, Tyree et al. 2002; Flexas, Ribas-Carbo et al. 2006). *Arabidopsis thaliana* AtPIP1;1 Überexpression in Tabakpflanzen zeigte neben einer erhöhten Transpirationsrate auch eine höhere Dichte an Stomata und eine signifikant höhere photosynthetische Effizienz (Aharon, Shahak et al. 2003). Funktionelle Charakterisierungen einzelner pflanzlicher Aquaporine sind dagegen im Bereich der Gasleitung kaum publiziert. Uehlein *et al* (2003) konnte anhand der Expression des NtAQP1 in *Xenopus* Oozyten Hinweise auf eine  $\text{CO}_2$ -Leitfähigkeit finden und deren Relevanz für die Physiologie der Pflanze zeigen. Hanba *et al.* (Hanba, Shibasaka et al. 2004) überexprimierten das HvPIP2;1 aus Gerste (*Hordeum vulgare*) in Reispflanzen und wiesen dort eine erhöhte Photosynthese nach. Allerdings könnten dafür auch morphologische Veränderungen verantwortlich sein. Für die  $\text{NH}_3$ -Leitfähigkeit gibt es kaum physiologische Versuche. Viele der Erkenntnisse wurden über Wachstumstests von Hefe gewonnen. Die Analyse von Bertl und Kaldenhoff (2007), ist demnach eine der wenigen funktionellen Charakterisierungen einzelner pflanzlicher Aquaporine. Das dort verwendete System

wurde für die CO<sub>2</sub>-Messungen in dieser Arbeit optimiert. Generell lässt sich festhalten, dass die Unterschiede in den P<sub>CO<sub>2</sub></sub>-Werten zwischen den einzelnen gemessenen Konstrukten in dieser Arbeit nicht so deutlich waren, wie bei den entsprechenden Analysen der H<sub>2</sub>O-Leitfähigkeit durch Matthias Fischer (Fischer 2007). Das könnte daran liegen, dass die Hefepiasmamembran selbst eine relativ hohe CO<sub>2</sub>-Durchlässigkeit besitzt. Dies wurde an dem Hefeklon pGREG505\_2μ\_CA, der nur mit der Carboanhydrase transformiert war, deutlich. Dennoch konnten signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen modifizierten Aquaporinen aufgezeigt werden. Da alle Konstrukte in etwa gleicher Quantität in die Membran integriert wurden, müssen die Unterschiede in den Aquaporinen begründet liegen. Die ermittelten P<sub>CO<sub>2</sub></sub>-Werte dieser Arbeit insgesamt fallen mit einem Faktor von 10<sup>-3</sup> sehr niedrig aus. Sie liegen damit etwa zwei Größenordnungen unter dem Literaturwert für Lipid-Doppelschichten (Gutknecht, Bisson et al. 1977). Auch Yang *et al.* (Yang, Fukuda et al. 2000) erhielt für Erythrozytenmembranen mit *Stopped Flow* spektrophotometrischen Messungen CO<sub>2</sub> Permeabilitäten im Bereich von 10<sup>-3</sup>. Kritiker merkten hier an, dass eventuell unstirred layer Effekte auftraten, welche den Diffusionswiderstand der Membran erheblich erhöht haben könnten. Es wäre denkbar, dass dieser Effekt auch im Hefesystem auftreten und die Messungen beeinflussen kann.

#### 4.3 Untersuchung der 3Helix-Konstrukte

Über die Faltung von Aquaporinen ist noch wenig bekannt. Eine Studie von Buck *et al.* (Buck, Wagner et al. 2007) ergab jedoch, dass es anscheinend ein zweites konserviertes Aminosäuremotiv gibt, welches eine tragende Rolle bei der Faltung des Säuger AQP1 hat. Die beiden Aminosäurereste Asparagin (N) 49 und Lysin (K) 51 in der zweiten transmembranen-Helix interagieren mit Asparagin 185 am C-Terminus der fünften - Helix. Sie formen eine polare quaternäre Struktur, die die vielen Schritte der Faltung beeinflusst. Die Wasserstoffbrückenbindung zwischen N49 und N185 ist dabei wichtig für richtige Helix und Monomerbildung wie auch für die Funktion.

Dagegen ist K51 mit N185 benachbarter Monomere für die Stabilisierung des Tetramers verantwortlich. In der vorliegenden Arbeit wurde nun ein Aquaporinkonstrukt, welches die ersten drei transmembranen Helices von NtPIP2;1 enthielt, generiert. Der in der Studie erwähnte Aminosäurerest N185, der sowohl die Monomerbildung und Funktion als auch die Tetramer-Struktur unterstützt, fehlt hier. Dennoch konnte mittels Western Blot nachgewiesen werden, dass sich die drei Helices des Konstruktes scheinbar wie zu einem normalen Monomer und sogar zu einem Dimer zusammenlagern. Es ergab sich das gleiche Proteinbandenmuster, wie für ein natives NtPIP2;1. Der bei Buck *et al.* (Buck, Wagner et al. 2007) erwähnte Weg ist demnach nur eine Möglichkeit der Protein-Faltung. Anscheinend bergen die ersten drei Helices schon genug Information für die Konstruktion. Es wäre interessant zu untersuchen, ob noch kürzere Stücke des Proteins ebenfalls noch zu einer Faltung in der Lage sind. Man könnte auf diese Weise vielleicht drauf schließen, wo sich am Anfang des Proteins die entscheidende Stelle für die Faltung befindet. Über eine Funktionalität des 3-Helix-Konstruktes lässt sich dagegen bisher nichts sagen. Die CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit lag auf dem gleichen Niveau des nativen hoch wasserleitende NtPIP2;1. Das erste der beiden NPA-Motive ist in dem generierten Konstrukt noch vorhanden. Falls sich zwei dieser Motive zusammenlagerten, wäre die Formung einer Pore denkbar. Dazu müssten die 3-Helix-Konstrukte in unterschiedlicher Orientierung in die Membran inserieren. Eine Funktionalität der Pore wäre dann auch nicht ausgeschlossen. Da die CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit des halben, wie auch des nativen Proteins fast gleich ist, könnte die Information für eine Spezifität in den ersten drei Helices bzw. dem NPA-Motiv von NtPIP2;1 vorhanden sein. Eine vergleichbare Untersuchung des NtAQP1\_3Helix-Konstruktes hätte weitere Hinweise bringen können. Dieses wurde jedoch in den Hefezellen nicht exprimiert. Hätte man für dieses 3-Helix-Konstrukt im Vergleich zum nativen NtAQP1 eine ähnliche Charakteristik nachweisen können, wäre dies ein deutlicher Hinweis auf die funktionelle Bedeutung der ersten drei Helices eines Aquaporins. Der aus vier Aminosäureresten zusammengesetzte aromatische Arginin Selektivitätsfilter (Fu, Libson et al. 2000) kann bei dem

NtPIP2;1\_3Helix-Konstrukt nicht zum tragen kommen. Demnach müsste die Selektivität in diesem Fall durch eine andere Struktur erreicht werden.

#### **4.4 Analyse von n\_NtPIP2,1\_NtAQP1 (n\_P2A1)**

Anhand der Generierung eines chimären Proteins aus NtAQP1 und NtPIP2;1 wurde von Matthias Fischer untersucht, ob neben der Porenregion der Aquaporine auch die äußeren Domänen für eine H<sub>2</sub>O-Leitfähigkeit verantwortlich sind. Der Austausch des N-Terminus des NtAQP1 gegen den 13 Aminosäuren kürzeren N-Terminus des NtPIP2;1 führte zu einer geringen aber signifikanten Erhöhung der Wasserleitfähigkeit gegenüber der Kontrolle. Gegengleich konnte in der vorliegenden Arbeit ein signifikantes Absinken der CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit gegenüber dem unmodifizierten NtAQP1 gezeigt werden. Der P<sub>CO2</sub>-Wert lag auf dem Niveau der Kontrolle NtPIP2;1\_3Helix. Dies stützt die These einer Beteiligung des N-Terminus sowohl an der Wasser- als auch an der CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit. Untersuchungen ergaben vielfältige Modifikationen an den N-Termini bei *Arabidopsis thaliana* Aquaporinen (Santoni, Verdoucq et al. 2006; Maurel 2007). Für das PIP1 in *Arabidopsis* konnte eine Acetylierung des Methionins am N-Terminus nachgewiesen werden, wobei die Funktion jedoch nicht weiter analysiert wurde (Santoni, Verdoucq et al. 2006). Untersuchungen einer Mutante, die an dieser Stelle eine Veränderung aufweist, könnten hier Aufklärung bringen.

#### **4.5 Analyse der Homo- und Heterotetramere von NtAQP1 und NtPIP2;1**

In einigen Arbeiten wurde nachgewiesen, dass sich pflanzliche Aquaporine nicht nur zu Homotetrameren, sondern auch zu Heterotetrameren aus verschiedenen Isoformen zusammenlagern (Fotiadis, Jeno et al. 2001; Fetter, Van Wilder et al. 2004; Zelazny, Borst et al. 2007). Die Co-Expression von PIP1 und PIP2 Aquaporinen führte im Oozyten Modell zu einem Anstieg der Wasserleitfähigkeit gegenüber den einzeln exprimierten. Um einen genauen Hinweis darauf zu erhalten, in welchem Verhältnis die beiden Aquaporin-Isoformen vorhanden sein müssen, um Wasserleitfähigkeit zu erhalten, generierte Matthias Fischer (Fischer 2007) künstliche Heterotetramere aus

NtAQP1 und NtPIP2;1. Er untersuchte sie *Stopped flow* spektrophotometrisch in Schwellexperimenten mit Hefeprotoplasten. In der vorliegenden Arbeit wurde nun die CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit der künstlichen Heterotetramere und eines Homotetramers beobachtet. Es sollte geklärt werden, ob die Heteromerisierung einen Einfluss auf die CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit hat, und ob sich die Ergebnisse vielleicht gegengleich zu denen für Wasser verhalten. Das Monomer aus vier aneinander geknüpften NtPIP2;1 wies in dieser Analyse eine Leitfähigkeit für CO<sub>2</sub> wie die Kontrolle NtPIP2;1\_3Helix auf. Im Gegensatz dazu konnte für Wasser eine um 500 Mal gesteigerte Konduktivität gegenüber der Kontrolle ermittelt werden. Damit besitzt sowohl das artifizielle NtPIP2-Homotetramer, wie auch das native NtPIP2;1, kaum eine Durchlässigkeit für Kohlendioxid. Das Heterotetramer mit dem Verhältnis 3x NtAQP1 zu 1x NtPIP2;1 zeigte eine um 25% erhöhte CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit gegenüber der Kontrolle aber eine Erniedrigung von 9% gegenüber dem nativen NtAQP1. Für Wasser wurde im Vergleich eine um 40 fach gesteigerte Konduktivität dieses Konstruktes gegenüber der Kontrolle ermittelt. Das Hinzufügen eines Monomers des nicht-gasleitenden Aquaporins hat damit eindeutig sowohl eine Auswirkung auf die Wasser-, wie auch die CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit. Es ist vorstellbar, dass der Wassertransport in diesem Fall nur durch das eine Monomer stattfindet und diese Kapazität den restlichen NtAQP1 Monomeren abhanden kommt. Für das Konstrukt, wo je 1x NtAQP1 und 1x NtPIP2;1 hintereinander geknüpft sind, konnte eine um 13% verringerte Leitfähigkeit des Kohlendioxids gegenüber dem nativen NtAQP1 beobachtet werden. Gleichzeitig steigerte sich die CO<sub>2</sub>-Konduktivität um 21% gegenüber der Kontrolle. Entsprechende Versuche zur Wasserleitfähigkeit für einen Vergleich sind in diesem Fall nicht vorhanden. Das Konstrukt mit der Relation 2x NtAQP1 zu 2x NtPIP2;1 zeigte eine um 28% verminderte CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit, und war damit nicht mehr signifikant unterschiedlich zur Kontrolle während der Wassertransport etwa 50% höher gegenüber dem leeren Vektor war. Bei den beiden zuletzt erwähnten Konstrukten stellt sich die Frage, wie die Monomere angeordnet sind. Es könnte sein, dass bei der 1:1 Verbindung die beiden unterschiedlichen Dimere gegenüber zu liegen kommen,

während bei dem 2:2 Konstrukt auch eine diagonale Anordnung denkbar wäre. Vielleicht haben diese Strukturen ihren Anteil an den veränderten Leitfähigkeiten für CO<sub>2</sub>. Sollte der Transport doch durch die diskutierte Fünfte Pore stattfinden, würde eine Konformationsänderung durch Einbau von NtPIP2;1 ebenfalls eine Erklärung für verminderte Leitfähigkeit geben. Generell kommt diese Arbeit zu dem Schluss, dass sich die Konstrukte in ihren Leitfähigkeiten tatsächlich gegengleich verhalten. Das Beifügen eines NtPIP2;1 senkt die Gasleitfähigkeit. Je mehr PIP2-Einheiten dazukommen, desto weniger CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit zeigt das Konstrukt. Somit könnte dadurch tatsächlich eine Regulation des Wasser- oder Gastransportes in der Pflanze erreicht werden. NtAQP1 tritt sehr häufig in den Wurzeln der Pflanzen auf. Hier könnte eine Regulation der CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit wichtig sein, um CO<sub>2</sub> von der Respiration aus den Interzellularen zu entfernen. Ebenso könnte eine Adaption des NtAQP1 im Blatt an Umweltbedingungen erreicht werden.

#### 4.6 Analyse von TaTIP2;2 und seinen Mutanten

Bei Aquaporinen ist die Selektivität für verschiedene Stoffe schon erwiesen. So ist z.B. das NtAQP1 nicht nur für CO<sub>2</sub> sondern auch für Glycerin durchlässig (Biela, Grote et al. 1999; Cooper, Zhou et al. 2002). Bisher ist nichts darüber publiziert, ob bei einem Aquaporin vielleicht auch eine Leitfähigkeit für unterschiedliche Gase haben kann. Dieser Ansatz sollte in der vorliegenden Arbeit verfolgt werden. Um ein weiteres Aquaporin zu testen wurde das TaTIP 2,2 aus Weizen (*Triticum aestivum*), dem durch Bertl und Kaldenhoff (Bertl und Kaldenhoff 2007) eine hohe NH<sub>3</sub>-Leitfähigkeit nachgewiesen wurde, verwendet. Daneben standen zwei Mutanten dieses Aquaporins zur Verfügung. Durch Austausch der Aminosäure Asparagin mit Histidin an den Positionen 84 und 196 in beiden NPA Motiven sollte Aufschluss über die Spezifität gewonnen werden. Im Fall des HsAQP1 wurden diese Stellen nach Rechnergestützten Simulationen als enorm wichtig bezeichnet (Kong and Ma 2001). Ein Austausch der Aminosäure Asparagin mit Leucin ergab bei den Simulationen einen Einbruch der Wasserleitfähigkeit. Die *Stopped Flow* Analyse der NH<sub>3</sub>-

Leitfähigkeit beider TaTIP Mutanten zeigten im Vergleich zum unveränderten TaTIP2;2 tatsächlich keine Funktionalität (Muhammad Ayaz, persönliche Mitteilung). Es war interessant zu untersuchen, ob sich dieses für die CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit ebenso verhielt. Das unveränderte TaTIP2;2 wies keine CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit auf, ebenso die Mutante TaTIP N196H. Die Konduktivität der beiden lag auf dem gleichen Niveau wie die Kontrolle NtPIP2;1\_3Helix bzw. des nativen NtPIP2;1. Damit kann eine Spezifität für die zwei Gase NH<sub>3</sub> und CO<sub>2</sub> bei diesem Aquaporin nahezu ausgeschlossen werden. Erstaunlicherweise zeigte jedoch die andere Mutante TaTIP N84H eine hohe CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit, die unter Berücksichtigung des Standardfehlers auf der Höhe des NtAQP1 lag. Der veränderte Aminosäurerest ist im ersten NPA-Motiv lokalisiert. Bei der Simulation mit dem HsAQP1 wurde an diesen zwei Stellen die Aminosäure Asparagin gegen Leucin ausgetauscht. Beide Aminosäuren sind sich in ihrer Struktur recht ähnlich, während Histidin mit seinem Imidazolring einen anderen Aufbau hat. Histidine sind oft in den aktiven Zentren von Enzymen zu finden, da ihr Imidazolring schnell je nach pH von einem ungeladenen in einen positiv geladenen Zustand wechseln kann. Auch bei der Carboanhydrase sind drei Histidinreste im aktiven Zentrum zu finden. Es kann sein, dass das Aquaporin durch den Austausch der Aminosäure im ersten NPA Motiv den Durchweg für die CO<sub>2</sub> Moleküle unterstützt. Es wäre interessant zu analysieren, ob ein ähnlicher Austausch im NtAQP1 ebenfalls Auswirkungen hat und vielleicht die CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit zum Erliegen bringt. So könnte man auf die Besonderheiten der Struktur im Vergleich zu anderen, nicht CO<sub>2</sub>-konduktiven Aquaporinen schließen.

#### **4.7 Analyse des bakteriellen GlpF**

Der bakterielle Glycerin Facilitator GlpF aus *Escherichia coli* gehört mit zu den am besten untersuchten Membranintrinsischen Proteinen. Dies liegt unter anderem daran, dass seine Struktur durch Kristallisation schon durch die Gruppe um Braun aufgeklärt ist (Braun, Philippsen et al. 2000; Stahlberg, Braun et al. 2000). Es ist bekannt, dass GlpF, wie sein Name andeutet, eine hohe Leitfähigkeit für Glycerin hat

(Maurel, Reizer et al. 1994). Zu anderen Konduktivitäten fehlen jedoch Untersuchungen. Da sowohl das HsAQP1 als auch das NtAQP1 jeweils eine Leitfähigkeit für Glycerin besitzen und strukturell dem GlpF sehr ähnlich sind war es interessant zu analysieren, ob vielleicht das GlpF im Gegenzug auch eine CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit besitzt. Die Analyse ergab, dass dies tatsächlich der Fall war. Das GlpF wies eine ebenso hohe CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit auf, wie das NtAQP1. Es kann hier spekuliert werden ob Aquaporine die für Glycerin passierbar sind, generell auch gleichzeitig eine Spezifität für Gase bzw. CO<sub>2</sub> aufweisen. Hierzu müssten weitere Aquaporine, denen schon eine der beiden Leitfähigkeiten nachgewiesen wurde jeweils auf den anderen Stoff getestet werden. So ließe sich vielleicht auf eine gemeinsame Spezifität von Stoffen schließen.

#### 4.8 Untersuchung des Kaliumkanals TOK1

Auch der auswärts gleichrichtende Kaliumkanal TOK1 aus *Saccharomyces cerevisiae* ist schon gut untersucht. Jedoch wurde er zuvor nicht auf die Durchlässigkeit für andere Stoffe als Kalium-Ionen getestet. Wenn das recht große Kalium-Ion mit seiner Hydrathülle den Kanal passieren kann besteht die Möglichkeit dass kleinere Moleküle, wie das CO<sub>2</sub>, ebenfalls hindurch gelangen. Die *Stopped flow* spektrophotometrische Analyse ergab kaum eine Leitfähigkeit für CO<sub>2</sub>. Der Permeabilitätskoeffizient  $P_{CO_2}$  lag auf dem gleichen Niveau, wie von NtPIP2;1\_3Helix. Allerdings ist zu bedenken, dass auch hier der SY1-Hefestamm verwendet wurde, der zwar eine Defizienz für Aquaporine, aber nicht für Kaliumkanäle hat. Somit ist SY1 für diese Analyse nicht geeignet. Der TOK1 könnte in diesem Fall geschlossen vorliegen. Da die Hefe ihn zusätzlich bekommen hat, reguliert sie ihn vielleicht herunter.



## 5. Zusammenfassung

Für die Analyse verschiedener Leitfähigkeiten pflanzlicher Aquaporine haben sich bisher das *Xenopus* Oozytensystem und die *Stopped Flow* Spektrophotometrie von Hefezellen bewährt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich ein System von heterolog exprimierenden Hefezellen für die Messung der Kohlendioxid-Leitfähigkeit pflanzlicher Aquaporine mittels *Stopped Flow* Spektrophotometrie eignet. Dazu wurden die schon gut charakterisierten Aquaporine NtAQP1 und NtPIP2;1 aus Tabak (*Nicotiana tabacum*) verwendet.

Nach Optimierung der Methode konnten signifikante Unterschiede zwischen dem schon als CO<sub>2</sub>-leitfähig beschriebenen NtAQP1 und dem wasserleitenden NtPIP2;1 aufgezeigt werden. Daneben konnte nachgewiesen werden, dass der N-Terminus der Proteine, wie schon für Wasser (H<sub>2</sub>O) ermittelt, auch die Leitfähigkeit von CO<sub>2</sub> beeinflusst und wahrscheinlich am Mechanismus der Selektivität beteiligt ist. Anhand der unterschiedlich kombinierten Homo- und Heterotetramere von NtAQP1 mit NtPIP2;1 konnte dargestellt werden, dass auf diesem Weg eine Regulation der CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit möglich ist.

Zusätzlich wurde ein weiteres pflanzliches Aquaporin (TaTIP2;2) analysiert. Es sollte ermittelt werden, ob TaTIP2;2 neben dem Gas Ammoniak (NH<sub>3</sub>) auch eine Spezifität für CO<sub>2</sub> besitzt. Dies konnte in der Untersuchung nicht bestätigt werden. Experimente mit dem bakteriellen GlpF aus *E.coli* zeigten dagegen, wie für das strukturell sehr ähnliche NtAQP1, eine Spezifität für Glycerin und CO<sub>2</sub>. Dem ebenfalls gemessenen Kaliumkanal TOK1 aus *Saccharomyces cerevisiae* konnte dagegen in dieser Arbeit keine CO<sub>2</sub>-Konduktivität nachgewiesen werden.

Die Eignung des Systems für CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeits-Untersuchungen an Aquaporinen konnte damit aufgezeigt werden. Einige Ansatzpunkte zur weiteren Optimierung des Versuchsaufbaus wurden in dieser Arbeit dargestellt.

## 6. Literaturverzeichnis

- Aharon, R., Y. Shahak, et al. (2003).** "Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress." Plant Cell **15**(2): 439-47.
- Bertl, A. and R. Kaldenhoff (2007).** "Function of a separate NH<sub>3</sub>-pore in Aquaporin TIP2;2 from wheat." FEBS Lett **581**(28): 5413-7.
- Beuron, F., F. Le Caherec, et al. (1995).** "Structural analysis of a MIP family protein from the digestive tract of *Cicadella viridis*." J Biol Chem **270**(29): 17414-22.
- Biela, A., K. Grote, et al. (1999).** "The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol." Plant J **18**(5): 565-70.
- Bonhivers, M., J. M. Carbrey, et al. (1998).** "Aquaporins in *Saccharomyces*. Genetic and functional distinctions between laboratory and wild-type strains." J Biol Chem **273**(42): 27565-72.
- Boron, W. F., S. J. Waisbren, et al. (1994).** "Unique permeability barrier of the apical surface of parietal and chief cells in isolated perfused gastric glands." J Exp Biol **196**: 347-60.
- Braun, T., A. Philippsen, et al. (2000).** "The 3.7 Å projection map of the glycerol facilitator GlpF: a variant of the aquaporin tetramer." EMBO Rep **1**(2): 183-9.
- Buck, T. M., J. Wagner, et al. (2007).** "A novel tripartite motif involved in aquaporin topogenesis, monomer folding and tetramerization." Nat Struct Mol Biol **14**(8): 762-9.
- Burckhardt, B. C. and E. Fromter (1992).** "Pathways of NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> permeation across *Xenopus laevis* oocyte cell membrane." Pflügers Arch **420**(1): 83-6.
- Calamita, G., B. Kempf, et al. (1998).** "Regulation of the *Escherichia coli* water channel gene aqpZ." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3627-31.
- Choi, W. G. and D. M. Roberts (2007).** "Arabidopsis NIP2;1, a major intrinsic protein transporter of lactic acid induced by anoxic stress." J Biol Chem **282**(33): 24209-18.

- Cooper, G. J. and W. F. Boron (1998).** "Effect of PCMBs on CO<sub>2</sub> permeability of *Xenopus* oocytes expressing aquaporin 1 or its C189S mutant." Am J Physiol **275**(6 Pt 1): C1481-6.
- Cooper, G. J., Y. Zhou, et al. (2002).** "Transport of volatile solutes through AQP1." J Physiol **542**(Pt 1): 17-29.
- Coury, L. A., J. C. Mathai, et al. (1998).** "Reconstitution of water channel function of aquaporins 1 and 2 by expression in yeast secretory vesicles." Am J Physiol **274**(1 Pt 2): F34-42.
- Dean, R. M., R. L. Rivers, et al. (1999).** "Purification and functional reconstitution of soybean nodulin 26. An aquaporin with water and glycerol transport properties." Biochemistry **38**(1): 347-53.
- Endeward, V., R. Musa-Aziz, et al. (2006).** "Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for CO<sub>2</sub> transport across the human erythrocyte membrane." FASEB J **20**(12): 1974-81.
- Engelman, D. M. (2005).** "Membranes are more mosaic than fluid." Nature **438**(7068): 578-80.
- Fang, X., B. Yang, et al. (2002).** "Evidence against aquaporin-1-dependent CO<sub>2</sub> permeability in lung and kidney." J Physiol **542**(Pt 1): 63-9.
- Fetter, K., V. Van Wilder, et al. (2004).** "Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity." Plant Cell **16**(1): 215-28.
- Fischer, M (2007)** "Untersuchungen zur Modifikation von Aquaporinen aus *Nicotiana tabacum*." Dissertation TU-Darmstadt
- Flexas, J., M. Ribas-Carbo, et al. (2006).** "Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> in vivo." Plant J **48**(3): 427-39.
- Forster, R. E., G. Gros, et al. (1998).** "The effect of 4,4'-diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonate on CO<sub>2</sub> permeability of the red blood cell membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15815-20.
- Fotiadis, D., P. Jenö, et al. (2001).** "Structural characterization of two aquaporins isolated from native spinach leaf plasma membranes." J Biol Chem **276**(3): 1707-14.

- Froger, A., J. P. Rolland, et al. (2001).** "Functional characterization of a microbial aquaglyceroporin." Microbiology **147**(Pt 5): 1129-35.
- Fu, D., A. Libson, et al. (2000).** "Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity." Science **290**(5491): 481-6.
- Gerbeau, P., J. Guclu, et al. (1999).** "Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes." Plant J **18**(6): 577-87.
- Gutknecht, J., M. A. Bisson, et al. (1977).** "Diffusion of carbon dioxide through lipid bilayer membranes: effects of carbonic anhydrase, bicarbonate, and unstirred layers." J Gen Physiol **69**(6): 779-94.
- Hanba, Y. T., M. Shibasaka, et al. (2004).** "Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO(2) conductance and CO(2) assimilation in the leaves of transgenic rice plants." Plant Cell Physiol **45**(5): 521-9.
- Hill, W. G., R. L. Rivers, et al. (1999).** "Role of leaflet asymmetry in the permeability of model biological membranes to protons, solutes, and gases." J Gen Physiol **114**(3): 405-14.
- Hub, J. S. and B. L. de Groot (2006).** "Does CO<sub>2</sub> permeate through aquaporin-1?" Biophys J **91**(3): 842-8.
- Ishikawa, F., S. Suga, et al. (2005).** "Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in Arabidopsis thaliana." FEBS Lett **579**(25): 5814-20.
- Itada, N. and R. E. Forster (1977).** "Carbonic anhydrase activity in intact red blood cells measured with <sup>18</sup>O exchange." J Biol Chem **252**(11): 3881-90.
- Jansen, G., C. Wu, et al. (2005).** "Drag&Drop cloning in yeast." Gene **344**: 43-51.
- Johanson, U. and S. Gustavsson (2002).** "A new subfamily of major intrinsic proteins in plants." Mol Biol Evol **19**(4): 456-61.
- Jung, J. S., G. M. Preston, et al. (1994).** "Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model." J Biol Chem **269**(20): 14648-54.

- Kammerloher, W., U. Fischer, et al. (1994).** "Water channels in the plant plasma membrane cloned by immunoselection from a mammalian expression system." Plant J **6**(2): 187-99.
- Ketchum, K. A., W. J. Joiner, et al. (1995).** "A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem." Nature **376**(6542): 690-5.
- Kikeri, D., A. Sun, et al. (1989).** "Cell membranes impermeable to NH<sub>3</sub>." Nature **339**(6224): 478-80.
- Kojima, S., A. Bohner, et al. (2006).** "Molecular mechanisms of urea transport in plants." J Membr Biol **212**(2): 83-91.
- Kong, Y. and J. Ma (2001).** "Dynamic mechanisms of the membrane water channel aquaporin-1 (AQP1)." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(25): 14345-9.
- Kozono, D., X. Ding, et al. (2003).** "Functional expression and characterization of an archaeal aquaporin. AqpM from methanothermobacter marburgensis." J Biol Chem **278**(12): 10649-56.
- Kukulski, W., A. D. Schenk, et al. (2005).** "The 5A structure of heterologously expressed plant aquaporin SoPIP2;1." J Mol Biol **350**(4): 611-6.
- Laize, V., G. Rousselet, et al. (1995).** "Functional expression of the human CHIP28 water channel in a yeast secretory mutant." FEBS Lett **373**(3): 269-74.
- Liu, L. H., U. Ludewig, et al. (2003).** "Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in Arabidopsis." Plant Physiol **133**(3): 1220-8.
- Magni, F., C. Sarto, et al. (2006).** "Proteomic knowledge of human aquaporins." Proteomics **6**(20): 5637-49.
- Majeau, N. and J. R. Coleman (1992).** "Nucleotide Sequence of a Complementary DNA Encoding Tobacco Chloroplastic Carbonic Anhydrase." Plant Physiol **100**(2): 1077-1078.
- Maurel, C. (2007).** "Plant aquaporins: novel functions and regulation properties." FEBS Lett **581**(12): 2227-36.
- Maurel, C. and M. J. Chrispeels (2001).** "Aquaporins. A molecular entry into plant water relations." Plant Physiol **125**(1): 135-8.

- Maurel, C., J. Reizer, et al. (1994).** "Functional characterization of the Escherichia coli glycerol facilitator, GlpF, in Xenopus oocytes." J Biol Chem **269**(16): 11869-72.
- Maurel, C., F. Tacnet, et al. (1997).** "Purified vesicles of tobacco cell vacuolar and plasma membranes exhibit dramatically different water permeability and water channel activity." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 7103-7108.
- Mitra, B. N., R. Yoshino, et al. (2000).** "Loss of a member of the aquaporin gene family, aqpA affects spore dormancy in Dictyostelium." Gene **251**(2): 131-9.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987).** "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-50.
- Nakamoto, R. K., R. Rao, et al. (1991).** "Expression of the yeast plasma membrane [H<sup>+</sup>]ATPase in secretory vesicles. A new strategy for directed mutagenesis." J Biol Chem **266**(12): 7940-9.
- Nakhoul, N. L., B. A. Davis, et al. (1998).** "Effect of expressing the water channel aquaporin-1 on the CO<sub>2</sub> permeability of Xenopus oocytes." Am J Physiol **274**(2 Pt 1): C543-8.
- Paganelli, C. V. and A. K. Solomon (1957).** "The rate of exchange of tritiated water across the human red cell membrane." J Gen Physiol **41**(2): 259-77.
- Palmgren, M. G., P. Askerlund, et al. (1990).** "Sealed Inside-Out and Right-Side-Out Plasma Membrane Vesicles : Optimal Conditions for Formation and Separation." Plant Physiol **92**(4): 871-880.
- Potenza, M., R. Bowser, et al. (1992).** "SEC6 encodes an 85 kDa soluble protein required for exocytosis in yeast." Yeast **8**(7): 549-58.
- Prasad, G. V., L. A. Coury, et al. (1998).** "Reconstituted aquaporin 1 water channels transport CO<sub>2</sub> across membranes." J Biol Chem **273**(50): 33123-6.
- Prescott, D. M. and E. Zeuthen (1953).** "Comparison of water diffusion and water filtration across cell surfaces." Acta Physiol Scand **28**(1): 77-94.
- Preston, G. M. and P. Agre (1991).** "Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(24): 11110-4.

- Priver, N. A., E. C. Rabon, et al. (1993).** "Apical membrane of the gastric parietal cell: water, proton, and nonelectrolyte permeabilities." Biochemistry **32**(10): 2459-68.
- Quigley, F., J. M. Rosenberg, et al. (2002).** "From genome to function: the Arabidopsis aquaporins." Genome Biol **3**(1): RESEARCH0001.
- Reizer, J., A. Reizer, et al. (1993).** "The MIP family of integral membrane channel proteins: sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed pathway of evolution, and proposed functional differentiation of the two repeated halves of the proteins." Crit Rev Biochem Mol Biol **28**(3): 235-57.
- Robzyk, K. and Y. Kassir (1992).** "A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast." Nucleic Acids Res **20**(14): 3790.
- Sanford, J. C., F. D. Smith, et al. (1993).** "Optimizing the biolistic process for different biological applications." Methods Enzymol **217**: 483-509.
- Santoni, V., L. Verdoucq, et al. (2006).** "Methylation of aquaporins in plant plasma membrane." Biochem J **400**(1): 189-97.
- Siefritz, F., M. T. Tyree, et al. (2002).** "PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants." Plant Cell **14**(4): 869-76.
- Singh, S. K., H. J. Binder, et al. (1995).** "An apical permeability barrier to NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in isolated, perfused colonic crypts." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(25): 11573-7.
- Slavik, J. (1982).** "Intracellular pH of yeast cells measured with fluorescent probes." FEBS Lett **140**(1): 22-6.
- Slavik, J. (1983).** "Intracellular pH topography: determination by a fluorescent probe." FEBS Lett **156**(2): 227-30.
- Soveral, G., A. Madeira, et al. (2007).** "Water transport in intact yeast cells as assessed by fluorescence self-quenching." Appl Environ Microbiol **73**(7): 2341-3.
- Stahlberg, H., T. Braun, et al. (2000).** "The 6.9-A structure of GlpF: a basis for homology modeling of the glycerol channel from Escherichia coli." J Struct Biol **132**(2): 133-41.

- Suga, S. and M. Maeshima (2004).** "Water channel activity of radish plasma membrane aquaporins heterologously expressed in yeast and their modification by site-directed mutagenesis." Plant Cell Physiol **45**(7): 823-30.
- Sui, H., B. G. Han, et al. (2001).** "Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel." Nature **414**(6866): 872-8.
- Tajkhorshid, E., P. Nollert, et al. (2002).** "Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning." Science **296**(5567): 525-30.
- Thomas, D., P. Bron, et al. (2002).** "Aquaglyceroporins, one channel for two molecules." Biochim Biophys Acta **1555**(1-3): 181-6.
- Uehlein, N., C. Lovisolo, et al. (2003).** "The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO<sub>2</sub> pore with physiological functions." Nature **425**(6959): 734-7.
- Verkman, A. S., M. A. Matthay, et al. (2000).** "Aquaporin water channels and lung physiology." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **278**(5): L867-79.
- von Caemmerer, S., T. Lawson, et al. (2004).** "Stomatal conductance does not correlate with photosynthetic capacity in transgenic tobacco with reduced amounts of Rubisco." J Exp Bot **55**(400): 1157-66.
- Waisbren, S. J., J. P. Geibel, et al. (1994).** "Unusual permeability properties of gastric gland cells." Nature **368**(6469): 332-5.
- Walworth, N. C. and P. J. Novick (1987).** "Purification and characterization of constitutive secretory vesicles from yeast." J Cell Biol **105**(1): 163-74.
- Yang, B., N. Fukuda, et al. (2000).** "Carbon dioxide permeability of aquaporin-1 measured in erythrocytes and lung of aquaporin-1 null mice and in reconstituted proteoliposomes." J Biol Chem **275**(4): 2686-92.
- Zardoya, R. (2005).** "Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family." Biol Cell **97**(6): 397-414.
- Zelazny, E., J. W. Borst, et al. (2007).** "FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(30): 12359-64.



## 7. Anhang

### 7.1 Sequenzen

#### vollständige cDNA der Tabak-Carboanhydrase

```
1      cgacacaacg aattccgttg ctgtggtgag tgaggagtaa taaaagcaag caaaagctaa
61    aaggaagttc ttgagccaaa tgtcaactgc ttccattaac agttgcctta ctatctcccc
121   tgctcaagct tcccttaaga aaccaactcg tcctgttgct ttgcaaggc ttagcaactc
181   ttcttcttct acttctgttc ccagtctcat cagaaacgag cccgtcttcg ccgcccctac
241   tcccatcatc aaccctatth ttgagagaaga aatggcaaag gaatcctatg agcaggccat
301   tgctgcactc gagaaactcc tcagcgaaaa aggagaactt ggaccaattg ctgcagcaag
361   agttgaccag attacagctg aattgcaatc atcagatggc agcaaaccat tcgaccctgt
421   tgagcacatg aaagctggct ttattcactt caaaactgag aaatacgaga agaaccagc
481   cttatatggg gaactatcaa aaggccagag cccaagtgc atggtctttg cctgctctga
541   ctctcgagtg tgccatcac atgtcctgaa cttccaacct ggtgaggctt tcgtgggtccg
601   aaacatcgcc aacatggtcc ctgcttatga caagaccaga tactccggag tcggagcagc
661   tatcgaatac gctgttcttc accttaaggt agagaacatt gttgtcattg gccatagcgc
721   atgtggaggt atcaaaggtc tcatgtcttt acctgcagat ggttctgaat caactgcctt
781   cattgaggat tgggtgaaaa ttggtttacc tgccaaggcg aaggtgcagg gtgaacacgt
841   ggataaatgt ttgcagatc aatgcacagc ttgtgagaag gaagctgtga atgtgtcact
901   tggaaatttg ctgacctatc catttgtgag agaaggtttg gtgaagaaaa cactagcatt
961   gaagggaggt cactatgatt tcgtgaatgg aggatttgag ctgtggggac ttgagttcgg
1021  tctttctcct tctctttccg tatgaactta accaccgttt taagtggttt ttccctaac
1081  acttttgctt ttatgtaatt tccaaatcg aactgtatgt tgtgtatgt atcaaccaat
1141  attaaagagc accggttctt atatttctga ataaataaaa tgggagtcac tcttccttt
1201  attgtgaaaa aaaaaaaaaa aaa
```





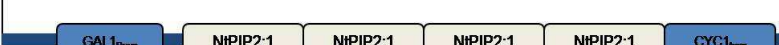




**Sequenz von NtAQP1\_3Helix**

```
1      cgcccgggca ggtgtactat ccacttagca caataaagag agaaaaacaa ggtaagtta
61     gtgagtgttc aaatggcaga aaacaaagaa gaagatgtta agcttgagc taacaaattc
121    agagaaacac agccattagg aacagctgct caaacagaca aagattacaa agaaccacca
181    ccagctcctt tgtttgaacc aggggaatta tcatcatggt cattttacag agctggaatt
241    gcagaattta tggctacttt cttgttttg tacatcacta tcttgactgt tatgggtctt
301    aagagatctg atagtctgtg tagttcagtt ggtattcaag gtgttgcttg ggcttttggt
361    ggtatgatct ttgctttggt ttactgtact gctggtatct caggaggaca catcaacca
421    gctgtgacct ttggattggt cttggcaagg
```

**Sequenz von NtPIP2;1\_3Helix**

```
1      gcgcgtactc cgaaagggaa tcgggttaaa attcctgaac cgggacgtgg cggttgacgg
61     caacgtggg aagtccggag acgtcggcgg ggggatacaa actcagttta acacatcttc
121    ttcaactgat cagaaaaatca gaagaaagaa acaatgtcaa aggacgtgat tgaagaagga
181    caagttcatc aacagcacgg gaaggattac gtggaccac caccagctcc ttgcttgat
241    ttgcagaac tcaagctctg gtctttcac agagctctta ttgctgagtt cattgctact
301    cttctttcc ttacgtcac tgttgcaact gtaattggc acaagaagtt gaatggtgct
361    gataaatgtg atggggttg tattcttgg atttctggg ctttggtgg catgattttt
421    gttcttgtt actgcactgc cggtatctct ggtggacaca
```

## 7.2 Verwendete Homo- und Heterotetramere Konstrukte

NtAQP1	NtPIP2;1		exprimiert
1	0		Ja
1/2	0		Nein
0	1		Ja
0	1/2		Ja
0	4		Ja
1	1		Ja
2	2		Ja
3	1		Ja
4	0		Nein

**Abbildung 7-I:** Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Aquaporin-Konstrukte aus NtAQP1 und NtPIP2;1 (Bild modifiziert nach der Dissertation von Matthias Fischer)

### 7.3 Auflistung der im Ergebnisteil dargestellten $P_{CO_2}$ -Werte

**Tabelle A-I:**  $P_{CO_2}$ -Werte der SY1-Hefezellen, die NtPIP2;1\_3Helix, das chimäre Protein n\_P2A1 sowie die nativen NtPIP2;1 und NtAQP1 exprimierten. (n= 100 ± Standardfehler; a und b bezeichnen die Signifikanzgruppen)

	NtPIP2;1_3Helix	n_P2A1	NtPIP2;1	NtAQP1
$P_{CO_2} [x 10^{-3} \text{ cm/s}]$	4,68 ± 0,2 a	4,90 ± 0,3 a	4,83 ± 0,2 a	6,31 ± 0,3 b

**Tabelle A-II:**  $P_{CO_2}$ -Werte der SY1-Hefezellen die künstliche Homo- und Heterotetramere wie aus NtPIP2;1 und NtAQP1 exprimierten. (n= 120 ± Standardfehler; a, b und c bezeichnen die Signifikanzgruppen)

	NtPIP2;1_3Helix	4 NtPIP2;1	2 NtAQP1_2 NtPIP2;1	NtAQP1_NtPIP2;1	3 NtAQP1_1 NtPIP2;1	NtAQP1
$P_{CO_2} [x 10^{-3} \text{ cm/s}]$	4,68 ± 0,2 a	4,87 ± 0,6 a	4,98 ± 0,3 a	5,70 ± 0,3 b	5,87 ± 0,3 b	6,31 ± 0,3 c

**Tabelle A-III:**  $P_{CO_2}$ -Werte der SY1-Hefezellen die TaTIP2;2 aus Weizen sowie zwei Mutanten bei denen an den Aminosäurepositionen 84 und 196 Modifikationen vorgenommen wurden, exprimierten. (n= 30 ± Standardfehler; a, b und c bezeichnen die Signifikanzgruppen)

	NtPIP2;1_3Helix	TaTIP 2,2 wt	TaTIP N196H	TaTIP N84H	NtAQP1
$P_{CO_2} [x 10^{-3} \text{ cm/s}]$	4,68 ± 0,2 a	4,85 ± 0,28 a	5,09 ± 0,4 a	7,10 ± 0,1 c	6,31 ± 0,3 b

**Tabelle A-IV:**  $P_{CO_2}$ -Werte der SY1-Hefezellen die, den Kaliumkanal TOK1 aus *Saccharomyces cerevisiae* und den Glycerin-Facilitator GlpF aus *E. coli* exprimierten. (n= 30 ± Standardfehler; a und b bezeichnen die Signifikanzgruppen)

	TOK 1	NtPIP2;1_3Helix	NtAQP1	GlpF E43A
$P_{CO_2} [x 10^{-3} \text{ cm/s}]$	4,56 ± 0,5 a	4,68 ± 0,2 a	6,31 ± 0,3 b	6,57 ± 0,2 b

## 7.4 Abkürzungsverzeichnis

<i>Ad</i>	lateinisch auf
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP	Aquaporin
Aqua dest.	<i>Aqua bidestilare</i> lateinisch Destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
<i>At</i> PIP	<i>Arabidopsis</i> Plasma Intrinsic Protein
Bidest. H <sub>2</sub> O	Bidestilliertes Wasser
BSA	Bovines Serum Albumin
°C	Grad Celsius
CA	Carboanhydrase
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CAPS	Cyclohexylaminopropansulfonsäure
cDNA	copy DNA
CF	Carboxyfluorescein
Cm	Centimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ev	empty vector; leerer Vektor
FBA bzw. FDA	chemisch Fluoresceinbisacetat, verkauft als Fluoresceindiacetat
g	Gramm
x g	Mal Erdbeschleunigung
GAL1	Gen für den Galaktoseinduzierbaren Promotor in Hefe
GlpF	Glycerin Facilitator F aus <i>E. coli</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Hypochlorid/ Salzsäure
HEPES	N- 2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIS3/4	Gen 3 bzw. 4 für den Histidinstoffwechsel
HsAQP1	homo sapiens Aquaporin 1
<i>In vitro</i>	lateinisch im Glas für Prozesse außerhalb des lebenden Organismus
<i>In vivo</i>	lateinisch im lebenden
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
k	Ratenkonstante in [s <sup>-1</sup> ]
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	di- Kaliumhydrogenphosphat
L	Liter
Leu	Leucin
LiAc	Litiumacetat
mA	milli Ampere
MeOH	Mercaptoethanol
MES	2-(N-Morpholino) ethansulfonsäure

---

MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
n =	Anzahl der Wiederholungen
NaCl <sub>2</sub>	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
NH <sub>4</sub>	Ammonium
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	di- Natriumhydrogenphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natrium- di- hydrogenphosphat
nm	Nanometer
NaNO <sub>3</sub>	Natriumnitrat
NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge
NaPO <sub>4</sub>	Natriumphosphat
NtAQP1	Nicotiana tabacum Aquaporin1
NtPIP2;1	Nicotiana tabacum Plasma Intrinsic Protein 2, 1
NTPs	Nukleosidtriphosphate
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
P <sub>CO2</sub>	Permeabilitätskoeffizient für Kohlendioxid
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglycol
pHf	finaler Intrazelluläre pH
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Surface, Oberfläche
SC	Selection Complete Media
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sec 4/6	Gen 4 bzw.6 im Stoffwechsel für Sekretorische Vesikel
Taq	Thermophilus aquaticus
TaTIP2, 2	Triticum aestivum Tonoplastic Intrinsic Protein 2, 2
TE	Tris- /EDTA Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TOK1	outward rectifier potassium channel, auswärtsrichtender Kaliumkanal in Hefe
U	Units, Einheiten
Ura	Uracil
UV	Ultraviolett
V	Volumen der Zelle bei der Berechnung des P <sub>CO2</sub>
V	Volt
wt	wildtyp
X- Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-beta-D-galactopyranosid
YNB	Yeast Nitrogen Base

---

**7.5 Ein-, bzw. Dreibuchstabencode der Aminosäuren**

A	Ala	Alanin	I	Ile	Isoleucin	R	Arg	Arginin
C	Cys	Cystein	K	Lys	Lysin	S	Ser	Serin
D	Asp	Asparaginsäure	L	Leu	Leucin	T	Thr	Threonin
E	Glu	Glutaminsäure	M	Met	Methionin	V	Val	Valin
F	Phe	Phenylalanin	N	Asn	Asparagin	W	Trp	Tryptophan
G	Gly	Glycin	P	Pro	Prolin	Y	Tyr	Tyrosin
H	His	Histidin	Q	Gln	Glutamin			

**7.6 Veröffentlichung von Teilergebnissen****Posterpräsentation**

4th International Conference on Aquaporins, Genval (Brussels) 2005, „CO<sub>2</sub> Permeability of Plant Aquaporins measured in Yeast Secretory Vesicles by Stopped Flow”

---

## Lebenslauf:

### Persönliche Daten:

Name: Nadine Pede

Geburtsdatum: 16.08.1976

Geburtsort: Leverkusen

Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung:

1983- 1987                      Gemeinschaftsgrundschule Herzogstrasse, Leverkusen

1987- 1996                      Landrat- Lucas Gymnasium, Leverkusen

Juni 1996                        Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulbildung:

1996- 2002                      Studium der Biologie mit den Hauptfächern Biotechnologie und Phytopathologie an der Westfälischen-Wilhelms Universität Münster Westfalen

2001- 2002                      Diplomarbeit mit dem Thema „Quantifizierung des Wachstums von *Fusarium graminearum* in Weizen unter Fungizideinfluß im Freiland und *in vitro*“ am Lehrstuhl für molekulare Phytopathologie bei Prof. Dr. Bruno M. Moerschbacher im Institut für Biochemie und Biotechnologie der Pflanzen, Westfälische-Wilhelms Universität Münster in Zusammenarbeit mit der Landwirtschaftskammer Westfalen-Lippe in Münster. 2002 Abschluss als Diplom Biologin

2003                                Arbeit beim Importunternehmen ItalMeat in Leverkusen

2004                                Arbeit beim Pflanzenzuchtunternehmen Lochow-Petkus in Bergen-Wohlde

2005- 2008                      Promotionsstudium bei Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff am Lehrstuhl für Angewandte Pflanzenwissenschaften der Technischen Universität Darmstadt. Anstellung als Wissenschaftlicher Mitarbeiter



---

**Erklärung:**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Darmstadt, März 2008

Unterschrift: